

**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOMEDICINA  
INDIRIZZO: VIROLOGIA  
CICLO XXIV**

**HIV-DNA cellulare e viremia residua in soggetti naïve trattati  
con terapia antiretrovirale efficace: studio longitudinale di una  
coorte**

**Direttore della scuola: Ch.mo Prof. Giorgio Palù  
Coordinatore dell'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Palù  
Supervisore: Ch.mo Prof. Saverio Giuseppe Parisi**

**Dottorando: Carlo Barbera**

## INDICE

<b>1.0 INTRODUZIONE</b> .....	1
<b>2.0 EPIDEMIOLOGIA</b> .....	2
<b>3.0 LA STRUTTURA DEL VIRUS</b> .....	3
<b>4.0 IL GENOMA DI HIV-1</b> .....	4
<b>5.0 PROTEINE VIRALI</b> .....	5
<b>5.1 Proteine strutturali ed enzimatiche</b> .....	6
5.1.1 Il gene env .....	6
5.1.2 Il gene pol .....	7
5.1.3 Il gene gag .....	8
<b>5.2 Proteine regolatrici ed accessorie</b> .....	9
<b>6.0 IL CICLO REPLICATIVO DI HIV-1</b> .....	12
<b>6.1 Adsorbimento, penetrazione e scapsidazione</b> .....	12
<b>6.2 Retrotrascrizione dell'RNA e integrazione del DNA nel genoma della cellula ospite</b> .....	13
<b>6.3 Produzione di mRNA e proteine virali</b> .....	14
<b>6.4 Maturazione assemblaggio e gemmazione</b> .....	16
<b>7.0 VARIABILITA' GENETICA DEL VIRUS</b> .....	16
<b>8.0 MODALITA' DI TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE DA HIV</b> .....	19
<b>9.0 LA PATOGENESI DELL'INFEZIONE DA HIV</b> .....	20
<b>9.1 Infezione acuta</b> .....	21
<b>9.2 Infezione cronica</b> .....	21
<b>9.3 Sindrome da immunodeficienza</b> .....	22
<b>10.0 TERAPIA ANTIRETROVIRALE</b> .....	22
<b>10.1 FARMACI ANTIRETROVIRALI</b> .....	23
10.1.1 Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa .....	24
10.1.1 Inibitori nucleosidici e nucleotidici della trascrittasi inversa .....	23
10.1.3 Inibitori della proteasi .....	24
10.1.4 Inibitori della fusione .....	25
10.1.5 Inibitori dell'integrasi .....	26
10.1.6 Inibitori del legame al corecettore .....	26
<b>11.0 DIAGNOSI</b> .....	26
<b>11.1 Avidità</b> .....	28
<b>11.2 Monitoraggio virologico del paziente in terapia</b> .....	30
<b>11.3 Viremia residua</b> .....	31
<b>12.0 HIV RESERVOIR</b> .....	32
<b>12.1 Altri reservoir virali</b> .....	34
<b>13.0 IL RUOLO DEL MONITORAGGIO DI HIV-DNA NELLA PRATICA CLINICA</b> .....	35
<b>14.0 SCOPO DEL LAVORO</b> .....	38
<b>15.0 MATERIALI E METODI</b> .....	39
<b>15.1 Disegno dello studio</b> .....	39
<b>15.2 Preparazione del campione</b> .....	40
<b>15.3 Estrazione di HIV-DNA cellulare</b> .....	40
<b>15.4 Real Time PCR</b> .....	41
<b>15.5 Quantificazione del DNA provirale</b> .....	43
<b>15.6 Viremia e stato immunologico</b> .....	44
<b>15.7 Analisi statistica dei dati</b> .....	45
<b>16.0 RISULTATI</b> .....	46
<b>16.1 Correlazioni significative tra variabili</b> .....	47
<b>16.2 Cinetica dei valori di HIV-DNA</b> .....	53
<b>17.0 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b> .....	62

**18.0 BIBLIOGRAFIA.....69**

## SOMMARIO/ABSTRACT

**BACKGROUND.** La valutazione della viremia plasmatica e la conta dei linfociti CD4+ dal sangue periferico sono oggi gli unici parametri di laboratorio considerati nel trattamento e nel follow-up del paziente HIV-positivo.

Recentemente è stato molto studiato il significato patogenetico del DNA virale presente nei linfomonociti del sangue periferico, e la sua bontà come marcatore prognostico di malattia.

**SCOPO DELLO STUDIO.** Lo studio contenuto in questa tesi si propone di approfondire le attuali conoscenze sull'HIV-DNA.

**MATERIALI E METODI.** È stata condotta la quantificazione dell'HIV-DNA cellulare mediante Real-Time PCR con sonde a idrolisi TaqMan®. I campioni provenivano da una coorte di 96 pazienti HIV-positivi seguiti dal reparto di Malattie Infettive e Tropicali dell'Azienda Ospedaliera di Padova, i cui soggetti, tra i criteri di inclusione, dovevano essere naïve e trattati con terapia antiretrovirale efficace. Altri parametri di laboratorio e altre caratteristiche dei pazienti sono stati prelevati dalla storia clinica dei pazienti.

**RISULTATI.** I risultati, sottoposti ad analisi statistica mediante il software Stata, dimostrano che esistono correlazioni tra HIV-DNA e alcuni parametri laboratoristici, e definiscono una cinetica dei valori di HIV-DNA.

**CONCLUSIONI.** I risultati confermano la possibilità di usare i valori di HIV-DNA come marcatore prognostico efficace nella terapia e nel *follow-up* dei pazienti HIV.

**BACKGROUND.** The evaluation of plasma viremia and the quantification of peripheral blood CD4+ lymphocytes are nowadays the only laboratory parameters used in treatment and follow-up of HIV-positive patients.

Recently, it was studied the viral DNA pathogenetic meaning in peripheral blood lymphomonocytes, and its usefulness as prognostic disease marker.

**OBJECTIVE.** To improve the actual knowledge on HIV-DNA.

**METHODS AND MATERIALS.** Cellular HIV-DNA was quantified by Real-Time PCR, using TaqMan® probes. The samples were collected by a 96 patients cohort of the Infectious and Tropical Diseases division of Padua Hospital. In order to be included in the cohort, the subjects needed to be naïve and treated with effective antiretroviral therapy. Other parameters and patients characteristics were obtained by the clinical history.

**RESULTS.** The results, processed by Stata software, show negative correlations between HIV-DNA and low amounts of residual plasma viremia, and describe an HIV-DNA values kinetic.

**CONCLUSION.** The results confirm the possibility to consider HIV-DNA values as an effective prognostic marker in treatment and follow-up of HIV patients

## 1.0 INTRODUZIONE

Nel 1980-81, la segnalazione di focolai di polmonite mortale da *Pneumocystis carinii* associata a segni di evidente compromissione del sistema immunitario [Harrison *et al.*, 2005] in soggetti adulti portò all'identificazione della sindrome oggi definita come "immunodeficienza acquisita" ed al sospetto che tale sindrome fosse causata da un agente infettante a trasmissione sessuale. Nel 1983 fu isolato pressoché contemporaneamente in Francia [Barrè-Sinoussi *et al.*, 1983] e negli Stati Uniti [Gallo *et al.*, 1984] il retrovirus oggi denominato HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), agente eziologico dell'AIDS.

Oggi sono noti due virus responsabili della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) umana [Myers *et al.*, 1992]: HIV-1 e HIV-2. HIV-1 è diffuso in tutto il mondo ed è responsabile della maggior parte dei casi di AIDS; HIV-2 è presente soprattutto in Africa occidentale, nei Caraibi e nell'America meridionale ed è meno virulento e provoca una malattia a decorso relativamente più attenuato.

Dal punto di vista della classificazione, HIV appartiene alla famiglia dei *Retrovirus*: essa comprende tre sottofamiglie (*Oncovirinae*, *Lentivirinae* e *Spumavirinae*) e sette generi, classificati in base a similitudini delle sequenze aminoacidiche a livello delle proteine della trascrittasi inversa, cinque dei quali sono stati correlati all'insorgenza di tumori nell'animale e almeno in un caso (Deltaretrovirus) nell'uomo. Nella sottofamiglia degli *Oncovirinae*, gli Alfaretrovirus, il cui prototipo è rappresentato dal virus del sarcoma di Rous, comprendono anche virus in grado di causare tumori negli uccelli quali, per esempio, il virus della leucemia aviaria (*Avian leukosis virus*) e il virus del sarcoma aviario (*Avian sarcoma virus*); i Betaretrovirus e i Gammaretrovirus sono rispettivamente causa di tumori mammari nel topo come il virus del tumore mammario del topo (*Mouse mammary tumor virus*), e di sarcomi nel gatto come il virus del sarcoma felino (*Murine leukemia virus*). I Deltaretrovirus comprendono il virus della leucemia bovina (*bovine leukaemia virus*) e i virus linfotropici dei primati (PTLV 1 e 2), quali i virus della leucemia della scimmia 1 e 2 (*Simian T lymphotropic virus type 1/2*) e il virus della leucemia umana delle cellule T di tipo 1 e 2 (HTLV: *Human T-lymphotropic virus type 1/2*) mentre al genere Epsilonretrovirus appartiene il virus del sarcoma dermico di Walleye, di esclusivo interesse veterinario.

Alla sottofamiglia *Lentivirinae* appartengono virus in grado di causare disordini di tipo degenerativo a carico del sistema immunitario e nervoso, caratterizzati da una progressione molto lenta [Letvin, 1990]: per esempio FIV (virus dell'immunodeficienza del

gatto) o SIV (virus della immunodeficienza della scimmia) e nell'uomo (HIV-1 e 2: virus dell'Immunodeficienza umana di tipo 1 e 2).

Nella sottofamiglia dei *Spumavirinae* viene descritto solo un genere, rappresentato dal genere Spumavirus, a cui appartiene il virus schiumoso dello scimpanzé, di cui non è noto il ruolo patogeno ma che possiede la caratteristica colturale, da cui deriva il nome della classificazione tassonomica, di determinare una caratteristica citopatologia "schiumosa" osservabile *in vitro*.

## 2.0 EPIDEMIOLOGIA

Secondo le stime WHO e UNAIDS del 2009, il numero delle persone infette da HIV nel mondo ha raggiunto 33,3 milioni (tra 31,4 e 35,3 milioni), di cui 2,5 milioni sono minori sotto i 15 anni, e 15,9 milioni le donne.

Nel solo 2009 sono stati infettati 2,6 milioni di persone, di cui 370000 bambini sotto i 15 anni; sempre nel solo 2009 sono morti per decessi AIDS-correlati ("AIDS deaths") 1,8 milioni di infetti, di cui 260000 sotto i 15 anni di età [WHO 2009 report on HIV epidemic].

Secondo il rapporto globale, delle 7000 nuove infezioni al giorno nel 2009, il 97% avviene in paesi a basso e medio reddito e circa 1000 di quelle colpiscono bambini sotto i 15 anni.

Sempre secondo stime WHO del 2009, gran parte di quei 33,3 milioni di infetti vive nell'Africa sub-Sahariana (22,5 milioni), tanto che in quella regione la prevalenza dell'infezione nella popolazione adulta è del 5% con picchi molto elevati in paesi quali Botswana, Swaziland e Zimbabwe, dove si stima che un individuo su tre sia sieropositivo al virus dell'AIDS. Oltre all'afrika sub-sahariana, tassi di diffusione dell'HIV particolarmente elevati sono presenti in America centrale, nei Carabi, in Europa orientale e in alcune regioni asiatiche come ad esempio l'India [Jones *et al.*, 1994].

In Europa Occidentale e Centrale, il numero degli infetti è 820000, mentre la prevalenza negli adulti è dello 0,2%. In questa regione, comprendente l'Italia, nel 2009 si sono infettate 31000 persone e sono morti per AIDS 8500 infetti, tra adulti e bambini [WHO 2009 report on HIV epidemic].

In Italia, sempre nel 2009, sono infette circa 140000 persone e la prevalenza negli adulti è dello 0,3%. Le morti da AIDS nel 2009 sono invece inferiori a 1000 [<http://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/italy>]. In particolare, nel Veneto, il tasso annuale di incidenza delle nuove diagnosi di infezione da HIV segnalate nel 2009 è di 4,4 per 100000 residenti.

Dal 1998 in Italia l'incidenza di nuove diagnosi è andata progressivamente stabilizzandosi, pur mantenendo una tendenza al calo che dura dal 1987. Sempre nel 2009, tra gli infetti il rapporto maschi/femmine è stato pari a 3,1; la proporzione di casi attribuibili a trasmissione sessuale (omo/eterosessuale) era pari al 79%, mentre i tossicodipendenti rappresentavano il 5,4%.

Infine, dal 2006 la proporzione di stranieri tra le nuove diagnosi si è stabilizzata, giungendo nel 2009 al 27,2%, così come l'età mediana al momento della diagnosi è andata progressivamente aumentando sino a giungere a 39 e 36 anni, rispettivamente nei maschi e nelle femmine.

Bisogna infine rimarcare che la diffusione dell'HIV-2 è estremamente bassa e limitata ad alcune nazioni dell'Africa Occidentale (in particolare, Guinea Bissau, dove la prevalenza dell'infezione raggiunge il 7% nella popolazione urbana) [Moroni *et al.*, 2008], ed è quindi per il maggior interesse epidemiologico che questa tesi, come la maggior parte degli studi attuali, si concentra sull'HIV-1.

### 3.0 LA STRUTTURA DEL VIRUS

La famiglia *Retroviridae* è costituita da ribovirus a struttura icosaedrica provvisti di *envelope* il cui genoma è, in modo assolutamente peculiare, formato da due molecole identiche di RNA a polarità positiva. All'analisi con microscopio elettronico la particella virale si presenta di forma rotondeggiante con diametro compreso tra i 100 e i 120 nm. Esternamente si può distinguere un involucro pericapsidico detto *envelope*, che riveste il nucleocapside o *core*. L'*envelope* è costituito da un doppio strato fosfolipidico al quale sono ancorate le glicoproteine virali. Il doppio strato non è di natura virale, ma deriva dalla membrana citoplasmatica della cellula ospite che il virione acquisisce durante la gemmazione, nelle fasi finali della replicazione [De Marco *et al.*, 2010].

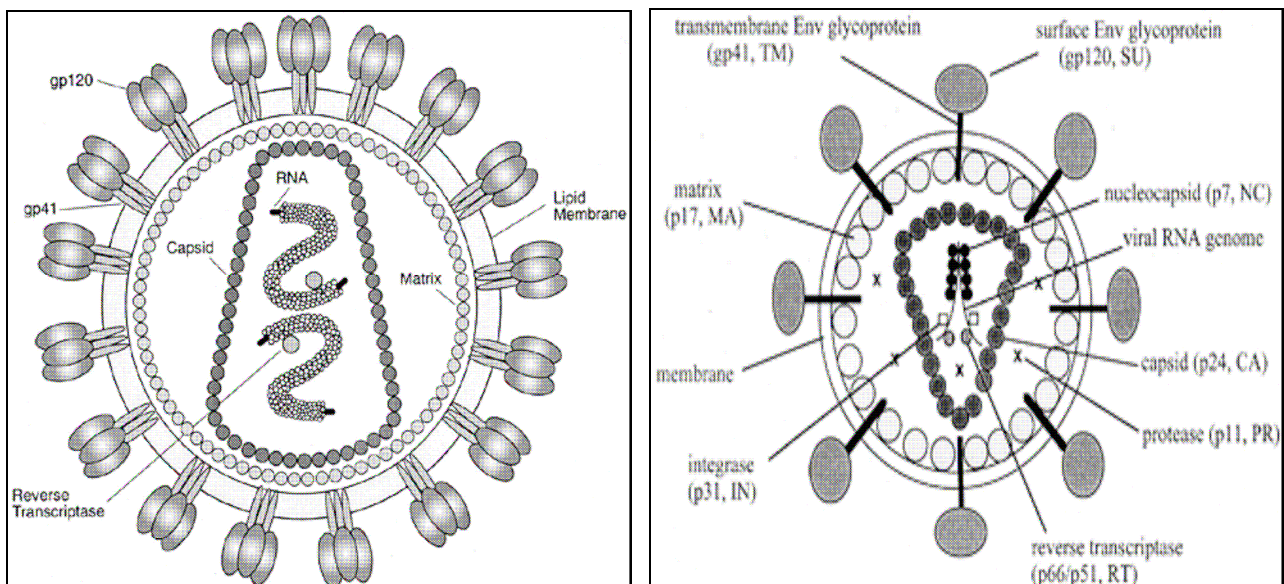
Numerosi aculei esterni sono osservabili attraverso la microscopia elettronica: essi rappresentano le proteine transmembrana gp41 e gp120, di cui la prima (gp41) è inserita attraverso l'involucro lipidico pericapsidico (proteina transmembrana), mentre l'altra (gp120), ancorata con la porzione carbossi-terminale all'estremo NH<sub>2</sub> terminale di gp41, è esposta sulla superficie del virione.

Associato alla faccia interna del doppio strato fosfolipidico c'è uno strato proteico cosiddetto di matrice costituito dalla proteina p17. Al di sotto dello strato proteico si presenta il nucleocapside o "*core*" del virus, che presenta la tipica forma cilindrico-conica



dei Lentivirus ed è costituito dalla proteina p24, codificata dal gene *gag*. Il dominio C-terminale di p24 riveste un ruolo importante per l'assemblaggio e permette la dimerizzazione della proteina, nonché la formazione di oligomeri Gag, mentre il dominio N-terminale partecipa alla liberazione del genoma dal capsid, quindi è essenziale per l'infettività del virus.

All'interno del nucleocapsid si trovano i componenti necessari alla replicazione del virus quali il genoma, costituito da due filamenti di RNA monocatenario a polarità positiva, molecole di tRNA necessarie per l'inizio della replicazione, proteine non strutturali prodotte da geni accessori e regolatori e i prodotti del gene *pol*, ovvero gli enzimi trascrittasi inversa, ribonucleasi H, integrasi e proteasi. Nel virione maturo il materiale genetico è complessato alle proteine basiche p7 e p9 prodotte, come p24 e p17, dal gene *gag* e necessarie per l'incapsidazione dell'RNA virale.



**Figura 1.** Organizzazione del virione maturo di HIV-1 [adattato da: Fields Virology, 4° edizione, 2002]

#### 4.0 IL GENOMA DI HIV-1

Il genoma di HIV è rappresentato da due filamenti identici di RNA a polarità positiva ognuno dei quali della lunghezza di circa 9200 nucleotidi. Le due molecole, poliadenilate all'estremità 3', sono mantenute insieme a livello dell'estremità 5' in un dimero speculare. A circa un centinaio di nucleotidi dall'estremità 5' la molecola di RNA genomico è appaiata con una piccola molecola di RNA di origine cellulare (tRNA) la cui funzione è quella di agire da innesco per la trascrittasi inversa.

Ai due estremi del genoma sono presenti sequenze regolatrici dette LTR (*Long Terminal Repeats*) che si formano dopo la retrotrascrizione dell'RNA virale in DNA all'interno della cellula ospite e che originano da sequenze terminali ripetute (*Terminal Repeats*) presenti già nell'RNA genomico. In queste regioni sono presenti sequenze fondamentali per l'integrazione, la trascrizione controllata e l'amplificazione della trascrizione.

Il genoma dei *Retrovirus* contiene 3 geni fondamentali, necessari e sufficienti alla replicazione completa con formazione di progenie virale:

- Il gene *gag*: codifica le proteine strutturali del capsido (p24, p17, p7);
- Il gene *pol*: codifica le proteine enzimatiche trascrittasi inversa, proteasi, endonucleasi/integrasi;
- Il gene *env*: codifica le proteine che, una volta glicosilate, formano le proteine dell'*envelope* virale.

Oltre a questi geni principali caratteristici di tutti i *Retrovirus*, il genoma di HIV contiene altre sei sequenze codificanti che danno luogo ad altrettante proteine con funzioni regolatrici ed accessorie nel ciclo replicativo virale; esse sono Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr e Vpu.

Una delle più marcate caratteristiche del genoma di HIV-1 è rappresentata dal notevole grado di variabilità dimostrabile tra differenti stipti virali isolati da diversi individui o tra stipti virali isolati dallo stesso individuo in momenti diversi dell'infezione, tanto che i virus vengono considerati "quasi-specie", in virtù del fatto che ogni isolamento virale porta alla produzione di una complessa mistura di virus genotipicamente distinti. Tale variabilità genomica di HIV-1 è rilevante per diversi aspetti della biologia del virus, che vanno dal tropismo di cellula o tessuto, al tipo di manifestazioni cliniche indotte, alla differente suscettibilità alla risposta immune dell'organismo ed alla virulenza *in vivo*, ed è in grado di condizionare la possibilità di elaborare adeguati vaccini in grado di evocare una risposta protettiva a spettro sufficientemente ampio.

## 5.0 PROTEINE VIRALI

Così come avviene per la totalità dei retrovirus conosciuti, tutte le proteine strutturali di HIV vengono sintetizzate come precursori proteici i quali sono poi successivamente processati da proteasi cellulari o proteasi virus-specifiche.

## 5.1 Proteine strutturali ed enzimatiche

### 5.1.1 Il gene *env*

Il gene *env* codifica per una proteina di 160 kDa (gp160), che viene scissa nelle glicoproteine gp120 e gp41 [Varmus *et al.*, 1989].

**Gp120** o **SU** (*surface*) è una proteina di 515 aminoacidi, la cui funzione principale è quella di promuovere il legame del virus alla membrana cellulare della cellula ospite mediante il riconoscimento della molecola CD4, considerata il principale recettore di HIV. CD4 è presente su linfociti T e monociti/macrofagi ed è costituito da quattro domini extracellulari Ig-simili. Il legame gp120-CD4 è condizione necessaria ma non sufficiente a consentire l'ingresso del virus nella cellula: è infatti richiesto il legame con specifici recettori per le chemochine che svolgono la funzione di corecettori virali [Clapham *et al.*, 1997]. Sulla base della specificità di queste molecole per il corecettore, HIV può essere suddiviso in due tipologie dipendenti dal tropismo: alla prima appartengono i virus a tropismo linfocitario, che riconoscono come corecettore la proteina CXCR4 e sono pertanto definiti X4; alla seconda appartengono i ceppi a tropismo macrofagico non inducenti la formazione di sincizi, che riconoscono il corecettore CCR5 e che sono pertanto definiti R5. E' la regione V3 di gp120 a recare determinanti che specificano selettivamente l'interazione con i corecettori cellulari, fornendo la chiave molecolare del tropismo verso linfociti T o macrofagi.

Variazioni conformazionali della glicoproteine gp120 in seguito al legame con CD4, con la conseguente esposizione di domini del peptide fusogeno situati all'N-terminale di gp41, regolano inizialmente il processo di fusione di HIV con la membrana cellulare [Alkhatib *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996]. L'analisi delle sequenze aminoacidiche di gp120 ha rivelato la presenza di cinque regioni discontinue, contenenti residui altamente variabili (V1-V5), distribuite in regioni altamente conservate. Il dominio V3, esposto come conseguenza del legame gp120-CD4, è il principale determinante di neutralizzazione e sembra rivestire un ruolo primario nelle fasi di infezione successive al legame; anticorpi diretti contro il dominio, infatti, bloccano la fusione tra virus e cellula senza inibire l'adesione a CD4.

**Gp41** o **TM (Transmembrane)** è una proteina di 345 residui aminoacidici situata nella membrana virale: essa è coinvolta sia nell'ancoraggio di gp120 all'*envelope*, sia nel

meccanismo di fusione tra la membrana virale e quella della cellula ospite in seguito al legame con il recettore.

L'estremo N-terminale di gp41 è responsabile dell'ancoraggio di gp120 alla membrana grazie al legame con la regione COOH-terminale della stessa, mentre l'attività fusogena è mediata dalla presenza di una sequenza altamente apolare, ricca di glicine, che risiede in prossimità dell'estremo NH<sub>2</sub> e viene esposta in seguito al legame di gp120 al recettore CD4 [Murray *et al.*, 2003]

**5.1.2 Il gene *pol*.** Il gene *pol* codifica per tre proteine virali a funzione enzimatica: la proteasi, la trascrittasi inversa e l'integrasi.

La **proteasi (PR o p10)** è una proteina di 99 residui aminoacidici, che agisce in forma di dimerico. Essa interviene nella processazione delle proteine virali a partire dai precursori poliproteici e gioca perciò un ruolo fondamentale nella maturazione della particella virale. PR agisce sia a livello della superficie cellulare durante il rilascio dei virioni, sia all'interno delle particelle già fuoriuscite dalla cellula, dove scinde i precursori Gag e Gag-Pol [Kaplan *et al.*, 1994]. La proteina, incapsidata come parte del precursore Pol all'interno dei virioni al momento della loro fuoriuscita dalla cellula, attiva una serie di riarrangiamenti conformazionali della progenie ancora immatura e non infettante e promuove il taglio di precursori poliproteici, consentendo così la maturazione e l'infettività della particella virale. La **Trascrittasi inversa (RT)** è un eterodimero con una subunità di 560 aminoacidi (p66) e una da 440 residui (p51), entrambe derivate dalla poliproteina Pol, contenenti ciascuna un dominio ad attività polimerasica.

RT è un enzima chiave per il ciclo replicativo di HIV, poiché permette la retrotrascrizione del genoma virale a RNA nella forma provirale a DNA, grazie alla sua azione DNA polimerasica RNA dipendente.

La retrotrascrittasi, nella subunità p66, possiede anche un dominio ad attività RNasica (*RNasi H*), che, durante la replicazione, degrada l'RNA dell'ibrido DNA-RNA, inducendo così la sintesi di un doppio filamento di DNA e il distacco del tRNA dal filamento neoformato [Davies *et al.*, 1991; Hostomsky *et al.*, 1991].

Nonostante le sequenze aminoacidiche delle due subunità appaiano simili, solo sulla p66 è presente il sito catalitico, caratterizzato da tre residui altamente conservati (Asp 110, Asp185, Asp186), mentre la p51 si presenta con una conformazione chiusa, funzionalmente inattiva [Kohlstaedt *et al.*, 1992].

Il meccanismo enzimatico in cui è coinvolta la trascrittasi inversa ha inizio all'interno della particella virale, quando questa non ha ancora iniziato la sua azione infettiva verso la cellula bersaglio. A questo livello avviene l'*annealing*, ovvero l'appaiamento del tRNA che fa da *primer* col genoma virale, in particolare con la sequenza PBS (*Primer Binding Site*), posta vicino all'estremo 5'. Il tRNA contatta così sia l'interfaccia del dimero della retrotrascrittasi che la regione C-terminale di p66. Le reazioni successive avvengono nella cellula ospite, a livello citoplasmatico, dopo la liberazione del genoma virale.

Caratteristica tipica della retrotrascrittasi virale è la sua scarsa fedeltà replicativa, essendo priva di un'attività esonucleasica di controllo in direzione 3'→5' [Mansky, 1998]; questa caratteristica dell'enzima porta alla formazione di circa 10 errori per ciclo di sintesi, originando così un'alta frequenza di variabilità nucleotidica fra i diversi ceppi che sta alla base dell'elevata variabilità di stipti virali presenti all'interno di uno stesso organismo [Coffin, 1995; Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995; Domingo *et al.*, 1999].

L'**endonucleasi-integrasi (IN o p32)** è una proteina di 288 aminoacidi che agisce sotto forma di tetrametro a livello del nucleo cellulare, dove catalizza una serie di passaggi che portano all'integrazione del DNA provirale nel genoma della cellula ospite [Rice *et al.*, 1996]. Strutturalmente ogni monomero è costituito da tre domini caratterizzati da una specifica struttura: il dominio N-terminale, quello catalitico e il C-terminale: il primo dominio è coinvolto nella dimerizzazione e contiene una struttura HLH (*helix-loop-helix*) analoga a quella presente nelle proteine leganti il DNA; il dominio catalitico è caratterizzato dalla presenza di un motivo conservato, il quale lega Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup>, ioni metallici necessari perché avvenga l'integrazione; l'ultimo dominio è coinvolto sia nella dimerizzazione sia nella formazione di legami aspecifici con il DNA [Masuda *et al.*, 1997; Brown, 1997].

**5.1.3 Il gene gag.** Il gene *gag* viene trascritto in un mRNA policistronico che codifica per quattro proteine originate dal taglio proteolitico del precursore p55: la proteina della matrice, la proteina capsidica, la proteina del nucleocapside e p6.

La **proteina della matrice (MA o p17)**, componente N-terminale della poliproteina Gag, è la proteina strutturale che rappresenta la matrice virale. Oltre ad avere un ruolo strutturale, legandosi alla faccia interna della zona di membrana cellulare dove avverrà la gemmazione, partecipa attivamente alla fase di assemblaggio delle particelle virali [Zhou *et al.*, 1994].

Essa riveste un ruolo importante per il trasporto dei precursori Gag e Gag-Pol verso i siti di assemblaggio virale a livello della membrana cellulare. MA contribuisce, inoltre, all'inserimento delle glicoproteine derivate da *env* all'interno della particella virale; queste proteine sono caratterizzate da lunghe code citoplasmatiche che vengono inserite nelle cavità originate nella configurazione spaziale della proteina trimerica.

La **proteina del capsido (CA o p24)**, presente in circa 2000 copie in ogni struttura virionica, costituisce il "core" del virus. Il dominio C-terminale della proteina interviene nell'assemblaggio del virus, nella dimerizzazione della proteina stessa e nella formazione di oligomeri Gag. E' costituito da una struttura distesa seguita da quattro  $\alpha$ -eliche e contiene una sequenza compatta detta MHR (*Major Homology Region*), in cui si trovano venti aminoacidi molto conservati, stabilizzata da legami idrogeno tra i quattro residui a minor variabilità [Harrison *et al.*, 2005]. E' la regione MHR che, interagendo con Gag, permette l'ingresso di Gag-Pol nel virione in formazione.

Il dominio N-terminale è invece essenziale per l'infettività poiché, grazie all'interazione con una chaperonina cellulare, la ciclofillina A, promuove l'incorporazione della proteina nel virione e partecipa all'*uncoating* virale.

La **proteina del nucleocapside (NC o p9)**, formata da 55 residui aminoacidici, ha la funzione primaria di portare l'acido nucleico completo all'interno della struttura virionica in formazione, legandosi al segnale di incapsidamento ( $\psi$ , *packaging signal*) dell'RNA, strutturalmente costituito da tre strutture a forcina localizzate in prossimità del sito donatore di splicing maggiore. Poiché p9 è una proteina basica, riveste l'RNA genomico nel core della particella, proteggendolo in questo modo dalle nucleasi.

La proteina p6, costituita da 51 aminoacidi C-terminali di Gag, è importante per l'incorporazione di vpr durante l'assemblaggio virale. La proteina contribuisce inoltre all'efficiente rilascio del virione dalla cellula ospite.

## 5.2 Proteine regolatrici ed accessorie

Le due proteine regolatrici principali sono rappresentate dalle proteine Tat e Rev, entrambe codificate da geni formati da due esoni collocati in zone separate del genoma virale, i cui messaggeri richiedono complesse operazioni di *splicing* dei trascritti iniziali.

**Tat (Transactivation gene):** è una proteina di 14 kD che una volta sintetizzata rientra nel nucleo cellulare e funziona da transattivatore della trascrizione del genoma provirale.

Invece che legarsi al promotore della trascrizione virale essa forma un complesso legandosi ad una sequenza specifica (Tat-responsive o Tar) degli RNA-messaggeri nascenti [Zhou *et al.*, 1995].

Tat è necessaria per stabilizzare i processi trascrittivi, conferisce “processività” alla RNA polimerasi II cellulare e può anche influire sul tasso di iniziazione della trascrizione. Pare che essa arruoli o attivi chinasi che fosforilano il dominio C-terminale dell’RNA polimerasi II, processo che favorisce la conversione di tale enzima da iniziatore a fattore di elongazione, impedendo così una terminazione prematura del trascritto.

**Rev (Regulatory of virus gene):** è una proteina di 19 kD che svolge una funzione importante nel favorire il trasporto e la regolazione degli mRNA virus-specifici:

Essa consente infatti la transizione dalla produzione di trascritti primari sottoposti a più eventi di *splicing* (che codificano le proteine regolatorie e accessorie Tat, Rev e Nef), a trascritti prodotti da un singolo *splicing* e codificanti proteine strutturali. In questo modo il gene controlla il passaggio da un’infezione quiescente ad una crescita virale attiva [Lewer *et al.*, 1991].

La proteina determina questa evoluzione trascrizionale legando il sito RRE (*Rev Response Element*), localizzato nella regione *env*. La regolazione svolta da Rev non è basata su un aumento della trascrizione degli RNA per le proteine strutturali, ma sul controllo del trasporto nucleo-citoplasma, sull’inibizione dello *splicing* prima dell’esportazione nucleare e sulla stabilizzazione dei trascritti corrispondenti attraverso il legame a RRE [Cullen *et al.*, 1998; Pongoski *et al.*, 2002].

Rev può anche inibire direttamente lo *splicing* bloccando l’ingresso nel nucleo di ribonucleoproteine responsabili dell’assemblaggio di uno spliceosoma funzionale.

Le proteine accessorie sono rappresentate da:

**Vpu (virus protein U):** codifica per una proteina di membrana di 81 aminoacidi, del peso di 16 kDa (p16), con un dominio citoplasmatico C-terminale e uno idrofobico N-terminale di 24 residui. Ha la funzione di facilitare il trasporto del prodotto del gene *env* verso la membrana cellulare: funzionalmente la proteina interviene nell’assemblaggio, nella maturazione del virione e nella liberazione della progenie virale. Per quanto riguarda il processo maturativi, p16 promuove la degradazione di CD4 responsabili della ritenzione

[Margottin *et al.*, 1998], a livello del reticolo endoplasmatico, delle proteine Env neosintetizzate, promuovendo così la loro esposizione sulla membrana cellulare.

**Nef (negative factor gene):** Il gene *nef* (*Negative regulatory Factor*) si trova nella regione 3'LTR e codifica per una proteina di 27 kDa (p27) miristilata all'N-terminale e a localizzazione prevalentemente citoplasmatica, che è la prima proteina ad accumularsi nelle cellule successivamente all'infezione con HIV. Inizialmente si pensava che Nef svolgesse un'azione di regolazione negativa della trascrizione virale, che veniva così rallentata. E' stato successivamente scoperto che, al contrario, essa ha principalmente una funzione di regolazione positiva della replicazione virale: ad esempio, sembra indurre una minore espressione delle molecole CD4 e MHC sulla superficie cellulare stimolando l'endocitosi di CD4 e la loro distruzione lisosomiale [Aiken *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1998], ostacolando così l'attività dei linfociti T citotossici. E' stato inoltre dimostrato che la trascrizione selettiva di *nef*, insieme a *tat*, avviene ad opera del provirus non integrato all'interno delle cellule CD4+ quiescenti: queste due proteine virali di concerto possono indurre l'attivazione portando infine all'attivazione e conseguentemente all'integrazione del genoma virale all'interno di queste cellule [Wu *et al.*, 2001].

**Vif (virion infectivity factor):** questa proteina, indispensabile per la produzione di virus infettanti, partecipa all'assemblaggio e alla maturazione delle particelle, intervenendo nell'elaborazione finale dei prodotti del gene *env*. Inoltre Vif pare sia coinvolta anche nell'adsorbimento e penetrazione nella cellula ospite, infatti ceppi virali di laboratorio, privi del gene *vif*, sono ancora in grado di replicarsi e produrre virioni normali, incapaci però di infettare cellule sensibili. La proteina è perciò essenziale per un'efficiente trasmissione del virus in cellule sane, mentre non influenza la diffusione cellula-cellula, che risulta solo ridotta in assenza del gene *vif* [Cohen *et al.*, 1996]. Sembra inoltre che la sua azione consista nel legarsi ad una particolare citosina-deaminasi (APOBEC3G) favorendone la degradazione attraverso un complesso ubiquitina-dipendente. Questo avrebbe conseguenze nella capacità del virus di dare luogo ad un ciclo replicativi produttivo completo [La placa, 2006];

**Vpr (viral protein R):** sembra avere un ruolo importante nel favorire il trasporto intranucleare del complesso nucleoproteico (genoma provirale e proteine associate) virale che provvederà alla successiva integrazione nel genoma cellulare [Agostini *et al.*, 2002; Sherman *et al.*, 2002].



La proteina, che sembra intervenire nella riattivazione dell'infezione latente, permette il rapido trasporto del complesso ribonucleoproteico al nucleo della cellula infettata, subito dopo l'*uncoating* del virus, grazie a specifiche sequenze di traslocazione nucleare dette NLS (*Nuclear Localization Signal*).

Vpr è responsabile anche del blocco del ciclo cellulare in fase G2 [He *et al.*, 1995; Chowdhury *et al.*, 2003] e dell'induzione della condensazione cromosomica, nonché della morte per apoptosi delle cellule T, in caso di una sua espressione prolungata.

## 6.0 IL CICLO REPLICATIVO DI HIV-1

Il ciclo di replicazione dell'HIV viene solitamente suddiviso in diverse fasi: in una prima fase avvengono gli eventi iniziali, quali la presa di contatto del virus con la cellula bersaglio, la penetrazione del virus e la successiva scapsidazione ad opera di enzimi cellulari; in una seconda fase il genoma virale a RNA viene retrotrascritto in DNA per poi assumere una forma intermedia, costituita da un complesso di proteine e DNA a doppio filamento, che viene traslocata nel nucleo cellulare dove avviene l'integrazione del DNA virale (provirus) nel genoma della cellula ospite; segue una terza fase di trascrizione del genoma virale in RNA messaggeri i quali, dopo opportuni eventi di *splicing*, vengono tradotti dall'apparato ribosomale cellulare nelle proteine virali; avviene quindi l'ultima fase nella quale le proteine virali vengono assemblate a formare nuove particelle virali e si ha il rilascio della progenie che gemma attraverso la membrana della cellula ospite.

### 6.1 Adsorbimento, penetrazione e scapsidazione

Il contatto tra il virione e la cellula bersaglio rappresenta il primo passo necessario all'infezione della cellula. Il virus prende contatto con la cellula mediante il legame tra la glicoproteina gp120 e la molecola CD4, una proteina di 55kDa che rappresenta il recettore principale per il virus. Il CD4 si trova espresso principalmente sui linfociti T *helper*, considerati il bersaglio d'elezione per HIV, e sui monociti/macrofagi; a tutt'oggi si è inoltre dimostrato che HIV è in grado di infettare anche altre tipologie cellulari quali fibroblasti, cellule dendritiche, linfociti B, linfociti T CD8+, cellule gliali, cellule endoteliali, cellule dell'epitelio intestinale e precursori emopoietici del midollo osseo [Pierson *et al.*, 2000].

Il legame della gp120 con il suo recettore comporta una modificazione conformazionale della glicoproteina virale che causa l'esposizione e l'attivazione della proteina

transmembrana gp41 [Schupbach *et al.*, 2000]: una volta esposta, gp41 interagisce con la membrana cellulare inducendo la fusione dell'*envelope* virale con il doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare [Murray *et al.*, 2003].

Il legame dell'HIV con il CD4 non è tuttavia sufficiente per l'ingresso del virus nella cellula ospite: al fenomeno partecipano anche altri fattori cellulari che fungono da corecettori. Questi corecettori sono stati identificati tra i recettori per le chemochine, in particolare l'interazione tra gp120 e CXCR4 è necessaria per la penetrazione dei linfociti T, mentre quella con CCR5 per la penetrazione di monociti/macrofagi [Settentau *et al.*, 1988; Harrison *et al.*, 2005].

La scoperta che i recettori delle chemochine sono co-responsabili per la fusione e la penetrazione del virus ha portato ad una revisione della classificazione dei vari ceppi virali: gli isolati virali possono pertanto essere suddivisi in base all'utilizzo di questi corecettori. In particolare, si possono distinguere ceppi X4 che hanno uno spiccato tropismo per le cellule T e ceppi X5 che mostrano un tropismo prevalente verso le cellule monocito-macrofagiche; esistono inoltre ceppi a doppio tropismo (X4/R5) che sfruttano entrambi i tipi di corecettori.

In seguito all'interazione fra gp120 e corecettore si verificano i cambiamenti conformazionali nella gp41: ogni gp41 contiene 2 domini  $\alpha$ -elica che modificandosi permettono l'inserimento della porzione amino-terminale della proteina (peptide fusogeno) all'interno del doppio strato fosfolipidico della membrana citoplasmatica, consentendo così la fusione del pericapside virale con la cellula e il successivo accesso del *core* virale nel citoplasma [Freed, 2001; Moore *et al.*, 2003].

## **6.2 Retrotrascrizione dell'RNA e integrazione del DNA nel genoma della cellula ospite**

Una volta avvenuta la scapsidazione si ha la sintesi di una prima catena di DNA complementare ad una delle catene di RNA genomico ad opera della trascrittasi inversa virale. Il neofilamento viene prodotto in due fasi: inizialmente vengono sintetizzati un centinaio di nucleotidi a partire da una molecola di tRNA specifica per una lisina (tRNA<sup>Lys</sup>) legata al genoma in prossimità dell'estremo 5'; quando l'enzima raggiunge l'estremità entra in gioco l'attività ribonucleasica dell'RT, che rimuove le sequenze di RNA ibridizzate al DNA neofornato. Rimane così esposto un piccolo tratto di DNA a singolo filamento (sequenza R) complementare al segmento presente all'estremo 3'; è a questo punto che si

verifica il primo salto della polimerasi, che si trasferisce al 3' grazie alla complementarità delle due sequenze R e riprende la copiatura in DNA della sequenza di RNA virale. Terminata la sintesi interviene l'attività ribonucleasica della RT, che elimina la maggior parte dell'RNA ibridato, lasciando solamente un innesco polipurinico tra il gene *env* e la sequenza U3. Da questo nuovo innesco inizia l'estensione del secondo filamento di DNA, trascritto sullo stampo del DNA neoprodotto ed in questo caso l'enzima funziona da DNA polimerasi-DNA dipendente.

Al termine della retrotrascrizione il genoma virale è costituito da una duplice catena di DNA lineare contenente ad entrambe le estremità le sequenze LTR (*Long Terminal Repeats*) e prende il nome di provirus il quale, associato alla proteina della matrice (p17), alla proteina Vpr e all'integrasi, forma il cosiddetto complesso di preintegrazione (PIC). La fase successiva della replicazione virale prevede la migrazione del complesso di preintegrazione nel nucleo cellulare, dove il DNA virale si integra nel genoma cellulare ad opera dell'enzima virale integrasi.

Una volta integrato il DNA virale rimane permanentemente associato al genoma della cellula ospite per tutta la durata della vita della cellula stessa, ed esso può rimanere trascrizionalmente inattivo, latente, o andare incontro ad una attiva produzione di progenie virale se le condizioni lo permettono. L'attivazione dell'espressione virale dipende infatti da numerosi fattori virali e cellulari.

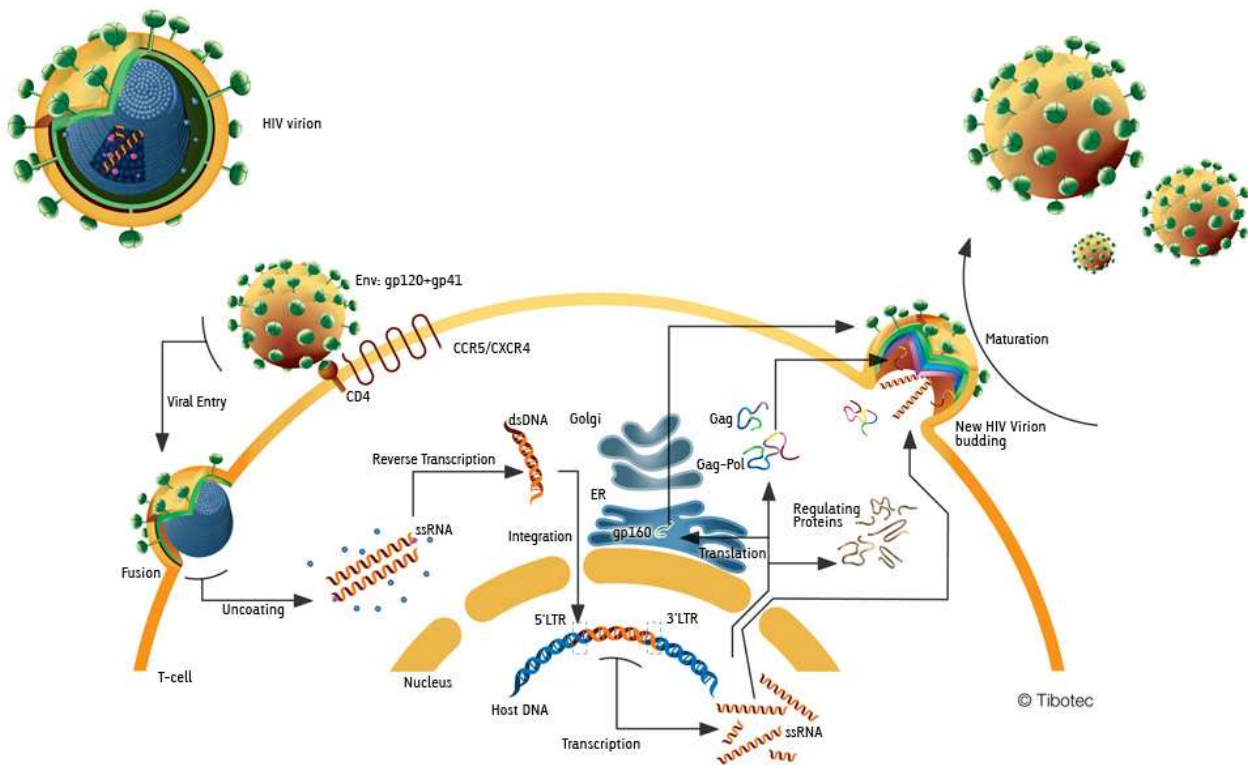
### **6.3 Produzione di mRNA e proteine virali**

La produzione di nuovi virioni avviene solo in alcune cellule infettate ed è legata all'attivazione fisiologica della cellula stessa da parte di stimolazioni ormonali o antigeniche. Infatti, sebbene nel genoma virale siano presenti geni codificanti proteine regolatrici della trascrizione, l'espressione genica virale avviene grazie alla collaborazione di fattori cellulari, come la RNA polimerasi II e i fattori di trascrizione Sp1 e NFκB, in assenza dei quali il virus permane in uno stato di latenza, caratteristico del 90% delle cellule infettate. Il promotore retrovirale del provirus si trova nel dominio U3 della regione 5' LTR.

Il genoma di HIV codifica tre classi di mRNA di diversa lunghezza che possono originarsi in funzione della presenza di diversi siti "accettori" di *splicing*. La prima classe consiste di mRNA di 2Kb, risultato di eventi multipli di *splicing*, che codificano per le proteine regolatrici Tat, Rev e la proteina Nef; la seconda classe di mRNA, di 4-5Kb di lunghezza, è

il risultato di singoli eventi di *splicing* e codifica per le proteine strutturali del virione (Vpr, Vpu, Vif e Env). La terza classe consiste di mRNA dell'intera lunghezza del genoma (9Kb), non sottoposti a *splicing*, che oltre a codificare le proteine Gag e Pol andranno a costituire il genoma della progenie virale neosintetizzata [Pavlakis *et al.*, 1992].

Nelle prime fasi della trascrizione nel nucleo della cellula si trovano solo mRNA che codificano per le proteine con funzione regolatrice. L'espressione tardiva porta invece alla trascrizione di mRNA che codificano per le proteine strutturali necessarie alle successive fasi di montaggio e produzione di nuove particelle virali. Il passaggio dalla prima alla seconda fase più tardiva dipende strettamente dall'azione della proteina Rev, che interviene nel trasporto degli mRNA dal nucleo al citoplasma. Altre proteine, quali Tat e Nef, regolano invece principalmente gli eventi di trascrizione [Pantaleo *et al.*, 1993].



**Figura 2.** Ciclo replicativi di HIV-1.

## 6.4 Maturazione assemblaggio e gemmazione

Il primo passo della fase di assemblaggio richiede il legame specifico tra l'RNA virale e una regione del precursore delle proteine del capsido: l'RNA virale possiede infatti una sequenza (*ps*, *packaging site*) all'estremità 5' necessaria per l'interazione con tali proteine. L'assemblaggio della particella virale di HIV si svolge a livello del citoplasma (come tutti i virus a RNA), dove l'aumentato livello di proteine e di genomi virali, raggiunta una concentrazione critica, dà il via al processo. Le proteine che andranno a formare il capsido si riuniscono al di sotto della faccia interna della membrana citoplasmatica, dove si trovano inserite la gp120, gp41 e p17. Inoltre, le proteine Vif e Vpu sono coinvolte in maniera importante nella fase di assemblaggio: la proteina Vpu aumenta la velocità di montaggio dei componenti del virione e accelera il rilascio delle particelle virali dalla membrana della cellula ospite; la proteina Vif sembra invece essere in grado di aumentare l'infettività delle nuove particelle virali prodotte.

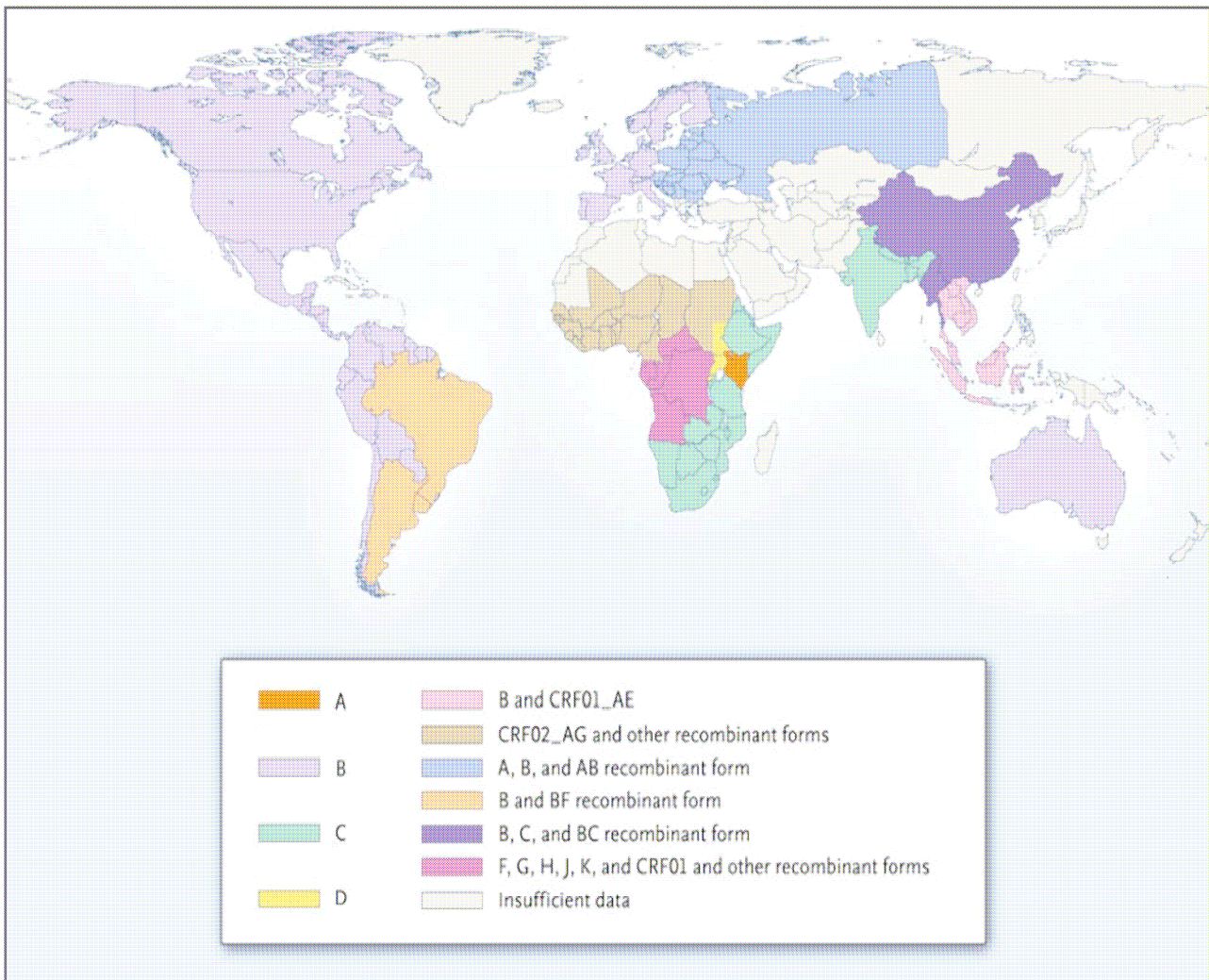
La maturazione è lo stadio in cui i virus diventano infettanti. Tale fase implica variazioni strutturali nella particella virale, che possono derivare da tagli specifici delle proteine capsidiche per formare i prodotti maturi, da cambiamenti strutturali durante l'assemblaggio e da modificazioni interne, come la condensazione delle proteine virali col genoma del virus.

Le proteasi sono un esempio di proteine coinvolte nella maturazione poiché, durante il rilascio del virione dalla cellula, tagliano il precursore derivato da Gag nei prodotti finali.

Lo stadio finale della maturazione delle particelle virali consiste nel rilascio delle particelle stesse dalla cellula ospite, processo che avviene per gemmazione dalla membrana cellulare, precedentemente modificata per l'inserimento delle proteine codificate dal gene *env*, attraverso la quale i virus acquisiscono l'*envelope* lipidico [Kaplan *et al.*, 1994].

## 7.0 VARIABILITA' GENETICA DEL VIRUS

Una delle caratteristiche peculiari di HIV-1 è l'estrema variabilità genetica che si manifesta non solo tra isolati di individui diversi, ma anche tra quelli di uno stesso soggetto nel corso dell'infezione. Le basi molecolari della variazione virale sono dovute sia all'elevata frequenza di errore nell'incorporazione dei nucleotidi da parte della trascrittasi inversa ( $3.4 \times 10^{-5}$  sostituzioni per ciclo replicativo) [Taylor *et al.*, 2008], sia alla marcata velocità di replicazione del virus.



**Figura 3.** Distribuzione globale corrente dei sottotipi di HIV-1 e delle forme ricombinanti [Fonte: Taylor et al., 2008]

Considerando che il genoma di HIV-1 è lungo circa novemila paia di basi e che la carica virale totale in soggetti con infezioni da HIV-1 è compresa tra i dieci e i cento miliardi di virioni, si può calcolare che ogni singola mutazione nucleotidica possa verificarsi tra le diecimila e le centomila volte al giorno, in ogni singolo paziente [Coffin *et al.*, 1995].

Questi fenomeni comportano che all'interno della popolazione virale possa insorgere rapidamente un'ampia divergenza genetica, generando in ciascun soggetto infetto delle quasi-specie, varianti virali strettamente correlate ma distinte.

Inizialmente, gli isolati di HIV-1 sono stati raggruppati in distinti sottotipi sulla base dell'analisi filogenetica di sequenze parziali dei geni *gag* ed *env*. All'interno dell'albero filogenetico le varianti virali appartenenti al medesimo sottotipo risultavano raggruppate tra loro, costituendo dei gruppi monofiletici con un nodo comune; questo ha suggerito l'esistenza di un medesimo antenato comune per tutti i sottotipi noti.

In seguito all'identificazione di nuovi ceppi di HIV-1 e di CRF, caratterizzati mediante l'analisi dell'intero genoma virale, si è resa necessaria una revisione della tassonomia di HIV-1 e l'introduzione di linee guida internazionali per una corretta nomenclatura.

Nella classificazione attuale [Robertson *et al.*, 1999], vengono riconosciuti tre gruppi filogenetici di HIV-1: M (Major), O (Outlier) e N (Non-M, Non-O o New).

La maggior parte delle infezioni da HIV su scala globale è sostenuta da virus del gruppo M, a cui appartengono tutti i sottotipi inizialmente identificati. I virus del gruppo O sono limitati alle popolazioni che vivono in Paesi dell'Africa centrale o epidemiologicamente correlate ad esse, in particolare il Camerun e i paesi limitrofi; tuttavia anche in queste aree rappresentano una minoranza delle infezioni.

All'interno del gruppo M si riconoscono nove sottotipi o *clade* (A, B, C, D, F, G, H, J e K), ritenuti originari dell'Africa centrale. I sottotipi rappresentano linee evolutive di HIV che hanno raggiunto una notevole divergenza genetica e spesso hanno una certa associazione con specifiche aree geografiche. Negli alberi filogenetici sono rappresentati da gruppi equidistanti tra loro, con una distanza evolutiva pari al 25-35% calcolata sulle sequenze aminoacidiche codificate dal gene *env*.

All'interno dei sottotipi A e F si distinguono due distinti sottogruppi, denominati sotto-sottotipi, A1, A2, A3 e F1, F2 ciascuno dei quali risulta più strettamente correlato all'altro sotto-sottotipo che ad un diverso sottotipo.

Anche i sottotipi B e D sono maggiormente correlati tra loro di quanto non lo siano con gli altri, essendosi probabilmente evoluti dallo stesso ceppo progenitore. Infatti all'analisi filogenetica risultano essere poco divergenti e dovrebbero essere più correttamente definiti sotto-sottotipi B1 e B2. Tuttavia, per non generare confusione, la designazione di sottotipo D è stata mantenuta nella nomenclatura.

Un nuovo sottotipo, per essere definito tale, deve essere valutato sulla base della sua intera sequenza e deve essere identificato almeno in tre soggetti epidemiologicamente non correlati tra loro. Recentemente è stato individuato e sequenziato l'intero genoma di un nuovo ceppo, provvisoriamente definito come sottotipo U, che essendo stato isolato unicamente in due soggetti, non può ancora essere considerato come il decimo sottotipo di HIV-1, non essendo soddisfatte le raccomandazioni definite dal Comitato Internazionale per la Nomenclatura di HIV [Mokili *et al.*, 2002].

Si ritiene che le forme genetiche di HIV-1 il cui genoma presenta porzioni che sono filogeneticamente correlate a distinti sottotipi si siano originate a seguito di eventi di ricombinazione tra distinti sottotipi in soggetti infettati con due o più ceppi virali.

I virus ricombinanti, identificati in almeno tre soggetti epidemiologicamente non correlati tra loro e caratterizzati dopo sequenziamento dell'intero genoma, vengono designati Circulating Recombinant Forms o CRF31 [Huang *et al.*, 2007]. Le CRF sono denominate con un numero progressivo che corrisponde all'ordine in cui vengono identificate, seguito dalle lettere dei sottotipi parentali (U indica le porzioni non classificabili) o da cpx (complex) per i ricombinanti che comprendono più di due sottotipi.

Ad oggi, sono state identificate 48 CRF32 che, per la maggior parte, sono geograficamente localizzate. Per la maggior parte di esse è stata pubblicata la caratterizzazione molecolare della struttura ricombinante; resta da chiarire il *pattern* di alcune di esse, di cui sono comunque disponibili in rete le sequenze.

Il fatto che il numero di CRF identificate recentemente continui ad aumentare suggerisce che l'eterogeneità di questi sottotipi sia significativamente superiore rispetto a quanto ritenuto correntemente. In un recente studio di sorveglianza è stato rilevato che l'impatto delle CRF nella pandemia globale di HIV-1 è in notevole aumento, rappresentando il 18% delle nuove infezioni [Osmanov *et al.*, 2002].

## **8.0 MODALITA' DI TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE DA HIV**

I rapporti sessuali, l'esposizione a sangue infetto e la trasmissione perinatale materno-fetale sono le tre principali modalità di trasmissione dell'infezione da HIV.

I rapporti sessuali sono il più importante fattore di rischio. La probabilità di trasmettere o acquisire l'infezione con un unico rapporto sessuale dipende da numerosi fattori, come ad esempio, il numero di partners, il tipo di rapporto sessuale, lo stadio della malattia del partner infetto e la coesistenza di altre infezioni a trasmissione sessuale.

La carica virale è il più importante fattore predittivo di trasmissione dell'infezione: la probabilità di contagio è massima nella fase acuta dell'infezione, si riduce gradualmente nei mesi successivi per aumentare di nuovo negli stadi terminali della malattia (Wawer *et al.*, 2003). La terapia antiretrovirale, abbassando la viremia, può ridurre in modo significativo, ma non annullare, il rischio di contagio per via sessuale (Musicco *et al.*, 1994; Hosseinipour *et al.*, 2002).

Dati epidemiologici e di laboratorio indicano che la coinfezione con altri agenti patogeni a trasmissione sessuale e la presenza di lesioni genitali aumentano il rischio di trasmissione dell'infezione (Piot *et al.*, 1999). Infatti, lesioni e processi infiammatori a carico del tratto genitale favoriscono la distruzione della barriera mucosale ed aumentano il numero di



cellule bersaglio di HIV, favorendo la penetrazione del virus (Stamm *et al.*, 1988; Plummer *et al.*, 1991; Dyer *et al.*, 1998).

Infine, poiché i rapporti sessuali per via anale provocano più facilmente delle lesioni rispetto a quelli per via vaginale, i rapporti omosessuali sono correlati ad un maggior rischio di trasmissione dell'infezione rispetto a quelli eterosessuali.

Tra i tossicodipendenti la trasmissione dell'infezione avviene per via parenterale, attraverso la condivisione di aghi infetti. Basse condizioni socioeconomiche, vagabondaggio e appartenenza a minoranze etniche sono associati ad un aumentato rischio di contagio (McCusker *et al.*, 1990).

La probabilità di contrarre l'infezione da HIV dopo aver ricevuto una trasfusione di sangue o di emoderivati da un sieropositivo si aggira intorno al 100% (Ward *et al.*, 1987; Donegan *et al.*, 1990). Il test di screening anticorpale per HIV venne introdotto nel 1985, con conseguente drastica riduzione del rischio di trasmissione dell'infezione tramite trasfusioni. Inoltre, sono stati riportati casi di trasmissione dell'infezione da HIV in seguito a trapianto d'organo solido (Erice *et al.*, 1991).

La trasmissione perinatale dell'infezione da HIV può avvenire durante la gestazione, al momento del parto o durante l'allattamento. Il rischio di contagio perinatale dipende dalla carica virale materna (Mofenson *et al.*, 1999; Jamieson *et al.*, 2003): madri con un'infezione primaria (Ehrnst *et al.*, 1991) o ad uno stadio avanzato della malattia (Ryder *et al.*, 1989) hanno una maggiore probabilità di trasmettere l'infezione ai figli. Oltre alla viremia materna, anche lesioni della barriera emato-placentare possono aumentare il rischio di trasmissione verticale dell'infezione. Infine, modalità meno comuni di trasmissione dell'infezione sono: l'esposizione professionale a materiale biologico infetto e l'inseminazione artificiale con liquido seminale contaminato.

## **9.0 LA PATOGENESI DELL'INFEZIONE DA HIV**

L'infezione da HIV viene tradizionalmente distinta in tre fasi: l'infezione primaria, la fase di latenza clinica e la sindrome da immunodeficienza.

L'avvento delle terapie antiretrovirali ha modificato in maniera sostanziale la storia naturale della malattia, portando ad un sensibile miglioramento delle condizioni cliniche dei soggetti infetti i quali, in mancanza di un intervento terapeutico efficace, sono destinati ad andare incontro ad un progressivo ed inesorabile depauperamento delle cellule CD4+ del sistema

immunitario che ha come conseguenza ultima un decorso fatale della malattia nell'arco dei 7-10 anni successivi all'infezione.

## **9.1 Infezione acuta**

Numerosi studi clinici, tra i quali anche i dati presentati in questa tesi, indicano come l'infezione acuta rappresenti un momento cruciale nella storia clinica del paziente dal quale potrà dipendere il decorso della malattia [Goujard *et al.*, 2006; Strain *et al.*, 2005, Wood *et al.*, 2005].

L'infezione acuta o primaria è definita come il momento immediatamente successivo al contagio ed è caratterizzato da una abbondante replicazione virale associata ad elevati livelli di viremia plasmatica ( $>10^6$  copie di HIV-RNA/ml) che sarebbe responsabile della disseminazione del virus a livello degli organi linfoidi. Questa disseminazione avviene ancor prima della risposta anticorpale, che si attiva alcune settimane dopo l'infezione (1 settimana-3 mesi), perciò tale intervallo è detto "periodo finestra", mentre la comparsa degli anticorpi è detta "sieroconversione".

In seguito ad un'efficace risposta immunitaria la viremia nel sangue si abbassa drasticamente [Cooper *et al.*, 1985]; questo probabilmente non riflette un'inibizione della replicazione virale, ma piuttosto un'efficiente azione del sistema nel rimuovere le particelle virali che si sono prodotte.

Tuttavia è da considerare che nell'infezione da HIV, accanto all'infezione produttiva controllabile dall'immunità cellulare e umorale, esiste anche un compartimento di infezione latente nel quale il DNA virale integrato nel genoma cellulare non viene temporaneamente espresso, con la conseguenza che permangono cellule latentemente infette, non riconosciute dal sistema immunitario, che sono potenzialmente in grado, in ogni momento, di dare origine ad un'infezione produttiva [Dianzani *et al.*, 1996]. Ne consegue che l'infezione acuta lascia strada inesorabilmente alla fase cronica.

## **9.2 Infezione cronica**

Lo sviluppo della risposta immunitaria specifica e la riduzione del carico virale nel sangue periferico segnano il passaggio dalla fase acuta a quella cronica, clinicamente latente, caratterizzata dalla mancanza di sintomi. Tuttavia, durante tale fase la replicazione virale non è assente ma continua a livello degli organi linfoidi: la fase di latenza clinica è in realtà

un momento dinamico dell'infezione, in cui si bilanciano un'elevata produzione ed eliminazione di particelle virali ed un rapido *turnover* giornaliero di cellule infette.

In questa fase si assiste inoltre a una progressiva diminuzione del numero di linfociti CD4+ circolanti e alla comparsa di difetti funzionali a carico sia dei linfociti CD4+ e CD8+, sia dei monociti e dei macrofagi, a cui si associa un progressivo deterioramento del sistema immunitario.

In assenza di trattamento farmacologico la maggioranza dei pazienti evolve verso la malattia (in genere quando il livello di linfociti CD4 scende sotto il valore  $350/\text{mm}^3$ ).

Una quota minore presenta un'evoluzione più rapida (*rapid progressor*) e una porzione, costituita da meno del 10% dei soggetti infetti, ha una tendenza a non ammalarsi anche dopo 12 anni di infezione. [Pantaleo *et al.*, 1993 (1) ; La Placa, 2006].

### 9.3 Sindrome da immunodeficienza

Il progredire dell'immunodepressione si riflette, come detto, in una diminuzione dei linfociti CD4 (nelle fasi finali meno di 200 linfociti/microlitro) e in difetti funzionali soprattutto in monociti-macrofagi, mentre la viremia (che in fase asintomatica si era assestata tra 1000 e 10000 copie RNA/ml) aumenta progressivamente fino a  $10^6$ ,  $10^7$  copie RNA/ml [Henrard *et al.*, 1994].

Questo deterioramento conduce alla fase clinicamente sintomatica della malattia che si manifesta inizialmente con linfadenopatia persistente (stadio "LAS", *Lympho-Adenopatic Sindrome*), seguito da una fase di perdita di peso, astenia, anemia, febbre, diarrea, ipergammaglobulinemia, che è definita stadio "ARC", ovvero *AIDS-related complex*.

L'insorgenza di infezioni opportunistiche (fase di AIDS conclamato) [Pantaleo *et al.*, 1993 (2)] sono la principale causa di morte; tra queste le più frequenti sono: toxoplasmosi viscerale, polmonite da *Pneumocystis carinii* (colpisce il 75% dei pazienti) e da Citomegalovirus, infezione erpetica disseminata.

## 10.0 TERAPIA ANTIRETROVIRALE

La storia della terapia antiretrovirale inizia nel 1987 con l'approvazione da parte della Food and Drug Administration (FDA) del primo farmaco a dimostrata efficacia terapeutica: l'azidovudina (AZT). Negli anni successivi sono stati approvati ed introdotti altri agenti antiretrovirali capaci di bloccare il ciclo replicativo di HIV. I primi regimi terapeutici utilizzati

comprendevano uno o due farmaci e spesso erano destinati al fallimento, ma a partire dal 1995, con l'introduzione dell'HAART, che consiste nell'associazione terapeutica di almeno tre agenti antiretrovirali, il trattamento dell'infezione da HIV ha subito una svolta radicale, con un forte incremento nella sopravvivenza dei soggetti trattati.

## **10.1 FARMACI ANTIRETROVIRALI**

Le classi di farmaci attualmente utilizzate nella terapia dell'infezione da HIV sono quattro:

- inibitori nucleosidici e nucleotidici della trascrittasi inversa (NRTI);
- inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI);
- inibitori della proteasi (PI);
- inibitori dell'integrasi;
- inibitori della fusione;
- inibitori del legame al co-recettore.

### **10.1.1 Inibitori nucleosidici e nucleotidici della trascrittasi inversa**

Gli analoghi nucleosidici della trascrittasi inversa inibiscono la replicazione di HIV, interferendo con la funzione polimerasica della trascrittasi inversa (RT) virale. Questi farmaci, una volta entrati nella cellula bersaglio, devono essere attivati nella forma trifosfato da parte di chinasi cellulari (Yarchoan *et al.*, 1989). Dal momento che l'attività della nucleoside chinasi varia a seconda della cellula bersaglio e del suo stato di attivazione, ugualmente la capacità di bloccare la replicazione virale da parte degli analoghi nucleosidici varia nei diversi compartimenti cellulari (Gao *et al.*, 1993). Le forme trifosfato dei farmaci hanno un'elevata affinità per la trascrittasi inversa virale e competono per il legame con i substrati naturali dell'enzima. Gli analoghi nucleosidici vengono incorporati nella catena di DNA nascente, provocando il precoce arresto della sintesi del DNA (Yarchoan *et al.*, 1989; Palmer *et al.*, 1998).

A differenza dei nucleosidici, gli analoghi nucleotidici necessitano di sole due fosforilazioni per essere attivati e, dal momento che gli enzimi responsabili della loro attivazione sono ubiquitari, gli inibitori nucleotidici della trascrittasi inversa possono svolgere la loro attività antiretrovirale nei confronti di un maggior numero di tessuti e bersagli cellulari.

Condividendo il meccanismo d'azione, gli NRTIs hanno anche effetti collaterali analoghi. Questi farmaci possono essere associati ad iperlactatemia asintomatica e, più raramente, ad acidosi lattica sintomatica e a severa epatomegalia con steatosi (Lonergan *et al.*, 2000;

Carr *et al.*, 2003). Tali effetti avversi possono essere dovuti alla capacità degli NRTIs di inibire la DNA polimerasi  $\gamma$ , coinvolta nella replicazione mitocondriale (Cui *et al.*, 1996; Birkus *et al.*, 2002).

L'azidovudina (3'-azido-2',3'-dideossitimidina; AZT) è un analogo del nucleoside timidina. La forma trifosfato del farmaco è un inibitore competitivo con affinità per la trascrittasi inversa 100 volte superiore rispetto al substrato naturale dell'enzima, la deossitimidina trifosfato (dTTP). L'azione del farmaco è dovuta alla sostituzione del gruppo ossidrilico in posizione 3' del ribosio con un gruppo azide. Ciò impedisce la formazione del legame 3'-5' fosfodiesterico con il nucleoside successivo, provocando l'arresto della trascrizione della catena di DNA nascente (Furman *et al.*, 1986; St Clair *et al.*, 1987).

Altri farmaci appartenenti alla classe degli NRTIs sono: la didanosina (2',3'-dideossinosina; ddI), analogo nucleosidico dell'adenosina; la zalcitabina (2',3'-dideossicitidina; ddC), la lamivudina ((-)-b-enantiomero della 2',3'-dideossi-3'-tiocitidina; 3TC) e l'emtricitabina ([-]-2',3'-dideossi-5-fluoro-3'-tiocitidina; FTC), analoghi della citosina; la stavudina (2',3'-dideidro-2',3'-dideossitimidina; d4T), analogo della timidina; l'abacacavir (ABC), analogo della guanosina. Il tenofovir (9-[-(R)-2-(fosfonometossi)propil]adenina; TDF), analogo dell'adenina, è l'unico analogo nucleotidico facente parte degli NRTIs.

### **10.1.2 Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa**

Gli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTIs) sono inibitori non competitivi, che si legano all'enzima virale utilizzando siti differenti da quelli dei nucleosidi. Una volta legatisi alla trascrittasi inversa determinano un cambiamento conformazionale dell'enzima, rendendolo incapace di svolgere la sua funzione. Gli NNRTIs attualmente utilizzati nella pratica clinica sono: la nevirapina (NVP), la delavirdina (DLV) e l'efavirenz (EFV).

### **10.1.3 Inibitori della proteasi**

La proteasi di HIV è un enzima essenziale affinché avvenga il clivaggio della poliproteina Gag e Gag-Pol (Greene, 1991). Numerose proteine di HIV, comprese quelle che costituiscono il core virale, la proteasi stessa, la trascrittasi inversa e l'integrasi, vengono sintetizzate come poliproteine ed hanno quindi bisogno di essere clivate dalla proteasi virale per produrre proteine mature. Gli inibitori della proteasi non necessitano di essere attivati all'interno della cellula bersaglio e sono capaci di bloccare il clivaggio delle

poliproteine negli stadi tardivi del ciclo replicativo di HIV, provocando la produzione di particelle virali difettive (Deeks *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1997).

Gli inibitori della proteasi che vengono attualmente utilizzati sono principalmente metabolizzati dal complesso enzimatico del citocromo P-450. Possono quindi interferire con il metabolismo epatico di numerosi altri farmaci, agendo come induttori o inibitori del citocromo P-450 (Piscitelli *et al.*, 1996; Flexner, 1998; Piscitelli *et al.*, 2001).

Molti effetti collaterali sono associati all'uso cronico dei PIs. La maggior parte degli inibitori della proteasi induce un aumento significativo dei livelli di colesterolo e trigliceridi nel sangue. Sono stati anche osservati iperglicemia e la comparsa di diabete mellito (Dube *et al.*, 1997; Eastone *et al.*, 1997; Dube, 2000). Una sindrome lipoatrofica, caratterizzata da perdita simmetrica del grasso sottocutaneo dalla faccia e dagli arti è stata osservata in seguito all'introduzione degli inibitori della proteasi nel regime terapeutico (Viraben *et al.*, 1998). Nei soggetti trattati con inibitori della proteasi è anche possibile che si sviluppino depositi adiposi a livello della base posteriore del collo e dell'addome, spesso associati ad ipertrigliceridemia (Lo *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1998). Infine, in pazienti sottoposti a regimi terapeutici comprendenti inibitori della proteasi, è stata osservata la comparsa di osteopenia, osteoporosi o osteonecrosi (Monier *et al.*, 2000).

Gli inibitori della proteasi attualmente in uso sono: il saquinavir (SQV), il ritonavir (RTV), spesso utilizzato in associazione con altri PIs perché capace di aumentarne i livelli ematici attraverso il blocco esercitato sul citocromo P-450, l'indinavir (IDV), il nelfinavir (NFV), l'amprenavir (APV), il fosamprenavir, profarmaco dell'amprenavir, il lopinavir (LPV), disponibile solo in associazione con il ritonavir, l'atazanavir (ATV), il tipranavir (TPV) ed il darunavir (DRV), questi ultimi due recentemente approvati dalla FDA.

#### **10.1.4 Inibitori della fusione**

Gli inibitori della fusione sono farmaci che agiscono in una fase precoce del ciclo replicativo di HIV. Il legame del virus alla cellula bersaglio avviene attraverso l'interazione tra il complesso glicoproteico gp160 virale ed il recettore cellulare CD4. Il complesso gp160 è costituito dalla glicoproteina di superficie gp120 e dalla glicoproteina transmembrana gp41. Gli inibitori della fusione si legano alla gp41, inibendo i cambiamenti conformazionali necessari affinché la fusione avvenga.

L'unico farmaco inibitore della fusione utilizzato nella pratica clinica è l'enfuvirtide. L'enfuvirtide è un peptide sintetico costituito da 36 amminoacidi che mima la struttura di parte del dominio HR2 della glicoproteina gp41 (Clavel *et al.*, 2004). Il legame tra farmaco

e HR1 blocca l'interazione tra HR1 e HR2, impedendo così la fusione tra la particella virale e la cellula bersaglio.

La necessità di somministrazione sottocutanea ed il costo elevato, limitano l'utilizzo dell'enfuvirtide a quei pazienti la cui infezione risulti non più controllabile con le altre classi di farmaci (Rockstroh, 2004).

#### **10.1.5 Inibitori dell'integrasi**

Il Raltegravir è l'unico farmaco approvato appartenente a questa categoria. Esso agisce bloccando l'enzima integrasi impedendo così l'integrazione del DNA virale nella cellula ospite e quindi la trascrizione del genoma di HIV ad opera dei meccanismi di trascrizione cellulari.

#### **10.1.6 Inibitori del legame al corecettore**

I farmaci di questa categoria mirano a bloccare l'entrata del virus nella cellula ospite non legando una componente virale, ma interagendo con il corecettore sulla cellula ospite [Vandekerckhove *et al.*, 2008].

### **11.0 DIAGNOSI**

La diagnosi di laboratorio dell'infezione da HIV si fonda sulla rilevazione della presenza di anticorpi virus-specifici, sulla rilevazione di antigeni virali e/o sulla determinazione della presenza di acidi nucleici virali, nonché sul diretto isolamento del virus dal paziente [Paolucci *et al.*, 2001].

Poiché il virus HIV causa un'infezione permanente nel soggetto contagiato, per effettuare una diagnosi di infezione è sufficiente rilevare la presenza anticorpale specifica per il virus nel siero del paziente (sieropositività), senza dover ricercare l'agente patogeno.

I criteri emanati dal CDC di Atlanta per effettuare diagnosi di infezione da HIV in soggetti di età superiore ai 13 anni sono:

- Positività ripetuta ai test di *screening* sierologici per anticorpi anti-HIV (test ELISA);
- Identificazione diretta del virus mediante isolamento dai tessuti del paziente;
- Rilevazione degli antigeni di HIV (es. p24);

Lo schema generale del protocollo diagnostico prevede dapprima il test per lo screening di base, costituito dalla ricerca di anticorpi anti-HIV nel siero mediante saggio immunoenzimatico ELISA, in cui gli antigeni virali (lisato virale, peptici ricombinanti gag ed env e/o peptici sintetici codificati dal gene *env*) sono adesi su fase solida. I saggi ELISA attualmente disponibili sono caratterizzati da una sensibilità molto elevata (superiore al 99,5%), a scapito di una specificità leggermente inferiore [Harrison *et al.*, 2005]. Una tale scelta è dettata dal rischio delle gravi conseguenze che potrebbero fare seguito a un risultato falsamente negativo, ad esempio nel caso di trasfusioni o trapianti da donatore infetto, e dalla disponibilità di saggi di conferma con elevata specificità.

I campioni positivi o indeterminati con il saggio ELISA vengono sottoposti ad un test di conferma che è oggi rappresentato da saggi di Immunoblotting o Western blot. Questo metodo consente di evidenziare la presenza di anticorpi diretti verso le singole proteine virali dopo che queste sono state separate mediante elettroforesi e trasferite su strisce di nitrocellulosa. I risultati ottenuti con Western blot vengono interpretati e la positività viene definita in base alla reattività per almeno una proteina del core e una proteina dell'*envelope*. I 3 criteri interpretativi più comunemente adottati prevedono:

- La reattività per almeno 2 proteine tra p24, gp41 e gp120/160 (Stati Uniti, CDC);
- La reattività per almeno 2 glicoproteine dell'*envelope*, gp41, gp120, gp160 (Organizzazione Mondiale della Sanità);
- La reattività per p24, p32 e gp 41 o gp120/160 (Stati Uniti, FDA).

Nei casi di reattività verso una sola proteina virale si ha un risultato indeterminato e perciò serve un secondo controllo dopo 15-30 giorni [Re, 2000].

Pur consentendo, di norma, una sicura diagnosi di infezione, la ricerca di anticorpi ha limiti di utilizzo in alcune circostanze:

- nella fase iniziale dell'infezione ("periodo finestra" di 3-4 settimane), poiché la quantità degli anticorpi circolanti non è ancora sufficiente ad essere evidenziata con le tecniche sierologiche;
- nei bambini nati da madri infette, poiché possiedono anticorpi sierici anti-HIV di origine materna (IgG), di nessun valore diagnostico;
- nei soggetti che dalle indagini sierologiche risultano "*borderline*", ovvero i cui risultati sono di dubbia positività.



Nei casi in cui non si può ricorrere ad indagini sierologiche o in caso di risultati indeterminati di queste ultime, è necessario ricorrere ad indagini virologiche in grado di evidenziare la presenza del virus in forma attiva o latente.

Questa ricerca può essere effettuata attraverso l'isolamento del virus in colture cellulari *in vitro* (ma questa tecnica è indaginosa e richiede tempi piuttosto lunghi e laboratori attrezzati), attraverso la dimostrazione della presenza di antigeni virus-specifici, soprattutto della proteina p24 del core virale, o di specifiche sequenze nucleotidiche, in particolare DNA provirale nei linfomonociti circolanti e l'RNA virionico nel plasma.

La ricerca di p24 e dell'RNA virale nel plasma assicurano un'elevata sensibilità nella diagnosi, ma per essere certi di un'infezione in atto la ricerca del DNA provirale nei linfomonociti circolanti, attraverso metodiche di amplificazione quali la PCR, è in assoluto la metodica che dà maggior affidabilità, rilevando la presenza di virus latente nella cellula (provirus) indipendentemente dalla replicazione virale e permettendo di ottenere una diagnosi in tempi più rapidi, senza dover manipolare virus infettante [Nuwayhid, 1995; Bru-Vezinet *et al.*, 1999].

Questa metodica risulta utile anche nei casi di bambini nati da madre sieropositiva, nei quali per esempio è indispensabile distinguere tra gli anticorpi autoctoni e IgG di origine materna, che possono persistere per 6-24 mesi e che perciò rendono impossibile l'uso dei test sierologici in bambini di età inferiore ai 18 mesi.

Per questi soggetti vengono perciò eseguiti test virologici utilizzando la PCR.

Nel primo mese di vita possono esserci dei falsi positivi, ma comunque già alla nascita un 38% dei bambini infetti risultano positivi alla PCR e la sensibilità della metodica aumenta, fino a raggiungere il 100% in 14-30 giorni [Cassol *et al.*, 1992].

### **11.1 Avidità**

L'identificazione di un'infezione recente da HIV è particolarmente importante in quanto è in grado di fornire informazioni preziose sulla dinamica dell'epidemia, sulle modalità di trasmissione, sui *patterns* di resistenza ai farmaci, permettendo di fornire così una guida per i programmi di intervento di salute pubblica e l'identificazione di candidati per *trials* clinici che abbiano come oggetto l'infezione acuta [Chawla *et al.*, 2006, Suligoj *et al.*, 2002]. L'avidità viene definita come la misura della forza con la quale gli anticorpi IgG si

legano all'antigene corrispondente, una proprietà che aumenta all'aumentare del tempo trascorso dal momento dell'infezione [Thomas *et al.*, 1996].

I metodi ad oggi utilizzati per l'identificazione di infezioni recenti da HIV furono introdotti per la prima volta nel 1998 e da allora sono sempre stati utilizzati con successo per discriminare tra infezione recente e infezione cronica [Murphy *et al.*, 2004; Schwarcz *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2003]. I saggi di avidità degli anticorpi maggiormente utilizzati oggi impiegano urea o guanidina per diluire gli anticorpi a bassa affinità e bassa avidità dopo che i legami antigene-anticorpo si sono formati. Nei soggetti con infezione recente, che presentano principalmente anticorpi a bassa avidità, l'intensità del segnale emesso dall'aliquota trattata con guanidina risulterà inferiore rispetto all'aliquota non trattata poiché tale agente rompe i legami deboli che si creano tra anticorpi a bassa avidità ed antigene. Il rapporto tra il segnale dell'aliquota con la guanidina e quello dell'aliquota con il tampone viene espresso come indice di avidità (AI), il cui valore aumenta con l'aumentare del tempo dalla sierconversione.

La performance del test viene valutata rispetto a differenti *cutoffs* (i.e., 0.75, 0.80) che discrimina l'infezione recente dall'infezione di lunga data.

Il test di avidità anticorpale presenta numerosi vantaggi, in particolare:

- permette di discriminare le infezioni recenti da quelle vecchie sulla base di un unico campione di siero che può essere anche congelato;
- fornisce un risultato quantitativo e non qualitativo (positivo/ negativo) che consente di scegliere diverse soglie, e quindi diversi livelli di sensibilità e specificità, a seconda degli obiettivi da raggiungere;
- è preciso e riproducibile, come dimostrato dallo studio di precisione effettuato;
- si basa su un test di *screening* con alta sensibilità sia per HIV-1 (incluso il sottotipo O) che per HIV-2;
- è poco costoso: i costi vivi sono relativi a due test di screening ed alla guanidina;
- è semplice da eseguire ed il fatto che venga effettuato in automatizzazione garantisce la riproducibilità dei risultati riducendo la probabilità di errori da manipolazione manuale;
- il metodo è standardizzato e non prevede alcuna modifica del protocollo del test anti-HIV che viene utilizzato, ma soltanto una prediluizione delle aliquote da testare; pertanto non necessita di alcuna approvazione da parte di enti regolatori nazionali o sovranazionali;

- non necessita di calibratori interni, e può essere applicato da qualsiasi laboratorio.

## 11.2 Monitoraggio virologico del paziente in terapia

Il monitoraggio del paziente in terapia rappresenta un passaggio cruciale nel controllo dell'infezione da HIV e nel rallentare il più possibile la sua progressione a AIDS: per fare ciò, le evidenze cliniche si basano essenzialmente sulla misurazione della viremia plasmatica (*viral load*) e sulla quantificazione della conta di linfociti T CD4+, sia assoluta che percentuale [Thompson *et al.*, 2010; European AIDS Clinical Society, 2011] .

La concentrazione di HIV-RNA nel sangue è un valore che permette di predire il rischio di progressione clinica di dell'infezione (marcatore prognostico) e di valutare l'entità della risposta terapeutica (marcatore di efficacia). Prima dello sviluppo di tecniche molecolari in grado di quantificare con precisione e riproducibilità la quantità di HIV-RNA presente nel sangue, l'entità della replicazione virale veniva stimata in base alla misura del titolo infettante HIV per mezzo dell'allestimento di colture quantitative a partire da cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) dei pazienti infetti; tuttavia, tali metodiche risentivano delle limitazioni dovute a bassi livelli di linfociti CD4+. Successivamente, lo sviluppo di tecniche molecolari ha consentito il dosaggio dei livelli di HIV-RNA in tutti tipi di paziente, indipendentemente dallo stato clinico.

Attualmente sono disponibili in commercio molteplici procedure di analisi per la misurazione dei livelli di HIV-RNA nel plasma di individui infetti da HIV; tali procedure si basano ciascuna su differenti tecnologie molecolari: amplificazione della regione *target* mediante reazione a catena della polimerasi con retrotrascrizione (RT-PCR); amplificazione del segnale mediante *branched-chain DNA* (bDNA); e amplificazione della regione *target* mediante tecnologia NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*). Recentemente inoltre, sono divenute disponibili diverse metodiche che impiegano metodiche di Real Time PCR, con metodo TaqMan o *molecular beacon*, che hanno permesso di ridurre ulteriormente i tempi necessari per l'esecuzione delle analisi e di abbassare ulteriormente i limiti di sensibilità e specificità delle metodiche.

### 11.3 Viremia residua

In seguito all'introduzione del monitoraggio della carica virale nel 1996, è stato possibile definire il livello di soppressione *target* utilizzando come riferimento le proprietà tecniche dei saggi commerciali disponibili, e tale livello era inizialmente di 400/500 copie/ml per i saggi di prima generazione, poi abbassato a 50/75 copie/ml con i saggi di seconda generazione. Prove evidenti ottenute da diversi *trials* clinici hanno dimostrato che il raggiungimento e il mantenimento di una carica virale inferiore alle 50 copie/ml è associato ad una sostenuta soppressione della carica virale plasmatica nel corso di periodi di *follow-up* prolungati. L'obiettivo principale della terapia antiretrovirale moderna pertanto è quello di mantenere livelli di HIV RNA plasmatici inferiori alle 50 copie/ml per il periodo più lungo possibile, sia in pazienti che affrontano il loro primo trattamento (first-line therapy) sia in pazienti che hanno già avuto un fallimento terapeutico [Thompson *et al.*, 2010]. Tuttavia, è stato anche dimostrato come pazienti con livelli di viremia plasmatica <50 copie/ml mantengano un certo grado di viremia residua, ed è oggetto di dibattito l'effetto che tale viremia residua (1-49 copie/ml) possa avere sul rischio di fallimento terapeutico [Gianotti *et al.*, 2012]. Ad oggi sono disponibili saggi di terza generazione che permettono di ottenere un limite di quantificazione di 20 copie/ml e sono in grado di offrire anche la rilevazione qualitativa di RNA virale al di sotto di tale *cutoff*.

Studi recenti [Gianotti *et al.*, 2012] sembrano indicare che non ci sia una diretta correlazione tra la viremia residua e la riattivazione della replicazione virale, con conseguente fallimento terapeutico, e tali risultati supportano l'ipotesi che la viremia residua si origini dalla attivazione occasionale di cellule infettate latentemente (*reservoirs*) piuttosto che da un'attiva replicazione virale plasmatica.

Va comunque considerato che la definizione, l'origine e la gestione della viremia residua sono ancora poco studiate e poco comprese e che ulteriori studi sono necessari per definire le migliori modalità per la rilevazione e l'intervento terapeutico. Se da una parte infatti la rilevazione della viremia residua con i moderni saggi di rilevazione potrebbe aiutare nel predire il rischio di riattivazione virale e, quindi, un fallimento della terapia, dall'altra parte esistono ancora poche prove del rapporto costi/benefici di tale monitoraggio. [Doyle *et al.*, 2012].

## 12.0 HIV RESERVOIR

Le terapie antiretrovirali correntemente disponibili sono in grado di sopprimere i livelli di HIV RNA al di sotto delle 50 copie/ml, che ad oggi è il limite di rilevabilità più basso raggiungibile dalla maggior parte dei test commerciali approvati nella pratica clinica [Dahl *et al.*, 2010]. Tuttavia, anche nei casi in cui la terapia è efficace, saggi ultrasensibili per la misurazione dell'RNA virale sono in grado di rilevare bassi livelli di viremia residua che persistono anche fino a 7 anni dall'inizio della terapia [Palmer *et al.*, 2008]. Concorrentemente, nel caso di sospensione della terapia antiretrovirale i livelli di virus presenti nel plasma risalgono rapidamente a valori rilevabili nell'arco di poche settimane [Davey *et al.*, 1999; Chun *et al.*, 2000] anche nel caso in cui la HAART è stata iniziata nel corso dell'infezione acuta [Markowitz *et al.*, 2002]. Questo si traduce dal punto di vista clinico nella necessità di assumere una terapia per tutta la durata della vita di un paziente. Diversi studi hanno dimostrato che una sottopopolazione di cellule CD4+ quiescenti isolate da individui HIV positivi sottoposti a regime di HAART contenevano HIV DNA integrato nel loro genoma [Chun *et al.*, 1997(1), Chun *et al.*, 1995; Chun *et al.*, 1997(2)] e che, in seguito a stimolazione, tali cellule erano in grado di produrre virioni infettanti [Finzi *et al.*, 1997]. In seguito a tali evidenze si è presto giunti alla conclusione che il virus dell'immunodeficienza acquisita può persistere sotto forma di provirus integrato in particolari distretti sia tissutali che cellulari, definiti *reservoirs*, che fungono da veri e propri serbatoi dai quali il virus è in grado, in seguito a riattivazione, di replicarsi e che rappresentano il maggiore ostacolo all'eradicazione dell'infezione [D'Ettorre *et al.*, 2010; Finzi *et al.*, 1997; Alexaki *et al.*, 2008].

Un *reservoir* virale può essere definito come una tipologia cellulare o un comparto anatomico dove forme virali competenti per la replicazione persistono per un periodo di tempo più prolungato e con proprietà cinetiche più stabili rispetto al *pool* principale [Blankson *et al.*, 2002].

Uno dei maggiori ostacoli all'eradicazione dell'infezione da HIV è rappresentato dalla presenza di linfociti T CD4+ quiescenti infettati latentemente con il virus [Chun *et al.*, 2005]: essi sono considerati per numerosi motivi il maggior contributo all'instaurazione e al mantenimento dei *reservoir* virali. E' noto da tempo che i linfociti T CD4+ sono le cellule maggiormente infettate nel corso di infezione da HIV [Schacker *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004] e che nel corso dell'infezione acuta, quando si formano i *reservoir* virali [Chun *et al.*, 1998], i linfociti T CD4+ quiescenti sono la tipologia cellulare maggiormente colpita dal

virus [Li *et al.*, 2000]. Esistono due diverse popolazioni di cellule CD4+ quiescenti: le cellule CD4+ naive e le cellule CD4+ della memoria. Sebbene l'infezione di entrambi questi sottotipi cellulari sia tipica dell'infezione da HIV [Ostrowski *et al.*, 1999], i linfociti T della memoria rappresentano il serbatoio ideale per il mantenimento a lungo termine del genoma virale. I linfociti CD4+ di memoria hanno una vita molto lunga, dato che la loro funzione biologica è proprio quella di garantire all'organismo una protezione immunitaria nei confronti di antigeni incontrati in precedenza; queste cellule, quando nel corso della loro vita incontrano l'antigene per il quale sono "programmate", ritornano alla fase attiva, durante la quale possono permettere al virus di replicarsi. In seguito, dopo diversi cicli di replicazione, molte di queste cellule andranno incontro a morte, mentre altre ritorneranno alla fase di latenza, contribuendo così al mantenimento di una stabile riserva virale. Questo serbatoio virale sarebbe quindi il principale responsabile della persistenza dell'infezione anche in corso di una efficace terapia antiretrovirale, rappresentando in questo modo il più importante ostacolo alla eradicazione dell'infezione. E' stato infatti dimostrato che tali cellule hanno un'emivita compresa tra i 44-47 mesi [Watanabe *et al.*, 2011; Siliciano *et al.*, 2003] e, di conseguenza, è stato calcolato che per la completa eliminazione del virus dall'organismo dovrebbero essere necessari 77,4 anni di terapia antiretrovirale efficace [Watanabe *et al.*, 2011]. Inoltre, poiché tali cellule sono quiescenti e non subiscono divisioni cellulari né vanno incontro a processi di attivazione o proliferazione in mancanza di appropriati stimoli ma bensì mantengono attivi solamente i processi cellulari basali necessari alla loro sopravvivenza, il loro apparato trascrizionale è tale da creare le condizioni per favorire la latenza virale con una capacità minima di supportare la trascrizione del genoma virale. Ciononostante, all'interno delle cellule può comunque avere luogo una produzione virale limitata ma sufficiente a "riseminare" il *pool* di cellule infettate produttivamente [Alexaki *et al.*, 2008]: sebbene infatti la presenza del provirus all'interno delle cellule T CD4+ quiescenti sia tipicamente associato alla latenza, esistono comunque prove che alcune di queste cellule siano in grado di produrre attivamente il virus, specialmente in pazienti con viremia rilevabile [Chun *et al.*, 2003]. E' opportuno notare come non tutte le cellule infette sviluppino un'infezione latente, ma è stato stimato che la frazione di linfociti T CD4+ quiescenti che albergano il genoma integrato di HIV-1 nel corso di infezione asintomatica sia nell'ordine di <0.05% del totale, il che rappresenterebbe due ordini di grandezza in meno rispetto al numero di cellule CD4+ attivate infettate produttivamente, e che il numero totale di cellule infettate latentemente è di circa  $10^5$ - $10^7$  cellule per individuo [Chun *et al.*, 1997(1)].

## 12.1 Altri reservoir virali

Oltre ai linfociti T CD4+ quiescenti della memoria, che come descritto rappresentano il maggiore sito di permanenza del virus, esistono numerosi altri compartimenti che fungono da serbatoio per il virus. Questi compartimenti di riserva, che si formano fin dalle primissime fasi dell'infezione, sono rappresentati da alcuni organi, quali organi linfoidi [Pantaleo *et al.*, 1991], cervello, gonadi (dove ci sono barriere anatomiche che impediscono la libera circolazione delle cellule e dei farmaci, permettendo così la creazione di condizioni particolarmente favorevoli per la persistenza del virus), e da alcuni compartimenti cellulari: le **cellule follicolari dendritiche** dei linfonodi (FDC), che sono in grado di trattenere sulla loro superficie esterna particelle virali che si possono mantenere infettive per lungo tempo. Esse pare abbiano un ruolo importante, soprattutto nelle prime fasi dell'infezione, per la loro funzione di presentazione dell'antigene che permette di portare il virus a contatto con gli organi linfoidi o i linfociti CD4+.

Queste cellule hanno una emivita di circa due settimane, quindi abbastanza breve.

2) i **monociti/macrofagi** [Muller *et al.*, 2002] infettati, che non vengono uccisi dal virus, il quale può pertanto continuare a replicarsi. L'emivita dei macrofagi in soggetti non infetti è circa 15 giorni. Il differenziamento dei monociti a livello del midollo osseo richiede circa due settimane, poi essi vengono liberati nel torrente circolatorio che lasciano definitivamente due giorni dopo per differenziarsi in macrofagi tissutali.

I monociti/macrofagi sono un compartimento in cui si instaura sia un'infezione cronica che un'infezione produttiva da parte di HIV, in assenza di effetto citopatico caratteristico invece delle cellule T attivate. La continua produzione virale e la capacità dei monociti di veicolare il virus in quasi tutto l'organismo rendono tale compartimento il più importante nel mantenimento dell'infezione.

E' noto inoltre che i monociti/macrofagi costituiscono la principale fonte di virus in caso di interruzione o fallimento della terapia antiretrovirale.

Il ruolo dei monociti è ancora controverso; sebbene sia possibile quantificare in essi il DNA di HIV-1 è difficile stimare la produzione virale da parte di queste cellule, in cui sono presenti barriere molecolari all'integrazione e alla trascrizione virale. Va dunque sottolineato come la natura stessa della popolazione monocitaria circolante non permette di definire i monociti come *reservoir* virale "a lungo termine" [Davey *et al.*, 1999].

### 13.0 IL RUOLO DEL MONITORAGGIO DI HIV-DNA NELLA PRATICA CLINICA

L'introduzione delle terapie antiretrovirali ad elevata attività (HAART) ha non solo contribuito a ridurre in maniera sostanziale la morbilità e la mortalità dell'AIDS, ma ha anche permesso di trasformare l'infezione da HIV in una condizione patologica cronica gestibile [Burton *et al.*, 2005; Mocroft *et al.*, 2000; Palella *et al.*, 1998]. Tuttavia, per migliorare ulteriormente tutti gli aspetti nel trattamento dell'infezione da HIV, sono necessari frequenti controlli virologici e immunologici allo scopo di individuare rapidamente eventuali segnali precoci di fallimento della terapia e di seguire attentamente l'evoluzione e l'eventuale insorgenza di varianti virali resistenti [Mellors *et al.*, 2007]. In questo contesto, lo studio della carica di DNA virale potrebbe rivelarsi un marcatore importante. Finora, la conta dei linfociti CD4+ e la carica plasmatica dell'RNA virale si sono dimostrati *markers* efficienti nella pratica clinica per il controllo e il monitoraggio del paziente HIV-positivo [Paolucci *et al.*, 2001]. In particolare: i livelli plasmatici di HIV-RNA forniscono informazioni sul grado di replicazione virale in corso. Tuttavia, i livelli di carica virale (VL) possono variare a causa di diversi fattori legati sia al virus che all'ospite in grado di influenzarli, come la fitness virale e l'immunoattivazione. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che non solo la replicazione virale non viene completamente abolita dalla terapia antiretrovirale [Clementi *et al.*, 2000; Re *et al.*, 2005; Kulkosky *et al.*, 2006; Zanchetta *et al.*, 2006], ma che il virus continua ad evolvere con la possibilità di sviluppare ceppi resistenti di quasispecie virali all'interno di sottopopolazioni cellulari che albergano l'infezione [Noë *et al.*, 2005].

Fino di recente non vi era la possibilità di utilizzare marcatori che potessero quantificare la carica di DNA virale presente a livello dei *reservoirs*. L'idea che HIV-1 DNA totale nei PBMCs possa avere una certa rilevanza clinica deriva da due piccoli studi del 1994 [Verhofstede *et al.*, 1994; Chevret *et al.*, 1994]. In seguito, numerosi studi hanno evidenziato come la quantificazione dell'HIV-DNA totale – provirale e non integrato – valutando le dimensioni dei *reservoir*, possa essere utilizzata nella fase pre-terapeutica come marcatore prognostico di fallimento virologico e immunologico, e nel corso del *follow-up*, come indicatore di progressione di malattia [Parisi *et al.*, 2012].

Oggi è possibile valutare l'evoluzione e la dinamica dell'infezione da HIV attraverso la misurazione della carica di HIV-DNA come marcatore in grado di fornire informazioni sulla quantità di virus presente a livello dei tessuti del sistema immunitario dell'ospite [D'Ettore *et al.*, 2010]. In particolare: la carica di HIV-DNA può fornire una stima del numero di



cellule infettate (inclusi i linfociti CD4+) e sulle dimensioni del serbatoio virale dal quale particelle virali infette potrebbero eventualmente essere prodotte e rilasciate [Pomerantz *et al.*, 2003; Re *et al.*, 2006], fornendo così un'idea sull'ampiezza dell'infezione.

La quantificazione e l'analisi della carica di HIV-DNA possono fornire ulteriori informazioni sullo stato dell'infezione da HIV e sui benefici di un inizio precoce della terapia antiretrovirale: è stato infatti dimostrato che una bassa conta di linfociti CD4+ associata ad una elevata carica di HIV-DNA nel corso dell'infezione primaria portano ad una rapida progressione verso l'AIDS e ad un aumento nel tasso di mortalità [Goujard *et al.*, 2006].

I vantaggi ottenuti dalla misurazione della carica di HIV-DNA si sono dimostrati utili anche nel corso del monitoraggio dell'infezione cronica: infatti, è stato dimostrato che anche in pazienti cronici che cominciano la terapia, coloro i quali presentavano una conta di linfociti CD4+ <350 cellule/ $\mu$ l e una carica di HIV-DNA <3log<sub>10</sub> copie/10<sup>6</sup> PBMCs presentavano un rischio minore di progressione clinica verso l'AIDS di pazienti con una conta linfocitaria >350 cellule/ $\mu$ l e carica di HIV-DNA >3log<sub>10</sub>/10<sup>6</sup> PBMCs [Kostrikis *et al.*, 2002]. Ne consegue che anche in presenza di un'alta conta linfocitaria il valore di DNA virale rappresenta un fattore di rischio di progressione della malattia.

Il ruolo di HIV-DNA come marcatore clinico è stato dimostrato anche da studi riguardanti il rischio di sviluppare patologie correlate all'infezione da HIV: due studi principali [Langford *et al.*, 2006; Shiramitsu *et al.*, 2007] hanno evidenziato come, in condizioni di viremia plasmatica non rilevabile, esista il rischio per il paziente HIV positivo di sviluppare disordini neurocognitivi legati all'infezione ed è stato successivamente dimostrato che esiste una correlazione positiva tra la quantità di HIV-DNA presente nelle cellule mononucleate del sangue periferico e l'insorgenza di disturbi neurocognitivi [Shiramitsu *et al.*, 2009].

Sebbene il ruolo della carica di HIV-DNA virale sia tutt'ora oggetto di studi circa l'importanza che questo valore possa assumere nel monitoraggio dell'infezione da HIV, è stato ormai dimostrato come:

- HIV-DNA sia un efficace marcatore nel predire la progressione della malattia più efficacemente di valori quali la viremia plasmatica e la conta linfocitaria [Rouizoux *et al.*, 2005] e sia possibile correlare i livelli di HIV-DNA nei PBMCs con l'efficacia della terapia antiretrovirale [McDermott *et al.*, 1999];
- I livelli di HIV-DNA possono essere usati come valori predittivi di *rebound* virali dopo interruzione del trattamento [Yerly *et al.*, 2004] e alti livelli di HIV-DNA misurati al

momento dell'interruzione del trattamento siano predittivi di un tempo più breve di sospensione della terapia farmacologica, laddove altri fattori quali i livelli di HIV RNA plasmatici pre-ART [Tebas *et al.*, 2002], il nadir dei CD4+ [Piketty *et al.*, 2010] e la precedente durata della terapia antiretrovirale non si sono dimostrati marcatori efficaci [Maggiolo *et al.*, 2004];

- Lo studio del HIV-DNA associato ai PBMCs è un interessante marcatore anche nel fornire informazioni riguardanti lo stato virologico e immunologico del paziente prima dell'inizio della terapia in quanto i suoi livelli correlano con lo *zenith* viremico ed hanno una relazione inversa con il nadir della conta delle cellule CD4+ [Burgard *et al.*, 2009], suggerendo che l'ampiezza del *reservoir* possa dipendere dall'intensità della replicazione virale al momento dell'infezione (prima della HAART) e aggiunge ulteriore credito all'ipotesi che un inizio precoce della terapia antiretrovirale possa avere effetti benefici anche sull'instaurarsi dei *reservoirs* [Ngo-Giang-Huong *et al.*, 2001];
- HIV-DNA è un predittore di successo a lungo termine in terapie semplificate che risparmiano l'uso di inibitori delle proteasi, tanto che pazienti sottoposti a queste terapie con livelli di HIV-DNA maggiori di 226 copie/106 PBMCs si sono dimostrati essere più prone a *blips* e fallimenti virologici [Sarmati *et al.*, 2007];

## 14.0 SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo di questo lavoro sperimentale è quello di valutare la quantità e la cinetica del decadimento dell'HIV-DNA cellulare in N pazienti infetti con HIV-1, che al momento dell'arruolamento nello studio fossero naive, ovvero non assumessero terapia antiretrovirale, e trattati con successo dall'inizio del regime terapeutico ( $T_0$ ) fino al momento del secondo controllo ( $T_2$ ).

Il presente studio longitudinale è stato disegnato al fine di investigare le possibili correlazioni demografiche (età, sesso, nazionalità, tipo d'infezione, fattori di rischio di trasmissione d'infezione quali etero/omosessualità e dipendenza da droghe iniettive), virologiche (HIV-DNA, viremia plasmatici), e immunologiche (conta percentuale ed assoluta dei linfociti CD4+) che siano determinanti di un basso livello di HIV-DNA cellulare in pazienti HIV positivi che abbiano raggiunto mediante terapia antiretrovirale efficace livelli di viremia plasmatici persistentemente non rilevabili (<50 copie HIV RNA/ml).

Più in generale, questa tesi cercherà di provare la capacità dell'HIV-DNA di predire, dai suoi valori raccolti al *baseline*, il raggiungimento dell'*undetectability* e l'evoluzione dei valori di HIV-DNA, per rafforzare l'ipotesi che HIV-DNA possa essere considerato un marcatore utile nella valutazione dell'infezione da HIV.

## 15.0 MATERIALI E METODI

### 15.1 Disegno dello studio

La coorte oggetto dello studio è costituita da 96 pazienti HIV positivi, afferenti al Reparto di Malattie Infettive e Tropicali dell'Azienda Ospedaliera di Padova, arruolati allo scopo di condurre uno studio di coorte prospettivo non randomizzato.

Al momento dell'arruolamento ( $T_0$ ), tutti i pazienti soddisfavano i seguenti criteri di eleggibilità:

- Avere compiuto il 18° anno di età;
- Essere *naïve*, ovvero non essere mai stati trattati con terapia antiretrovirale efficace prima dell'inizio dello studio;
- Avere raggiunto livelli di viremia plasmatica non rilevabili (<50 copie HIV RNA/ml di plasma) entro i primi 6 mesi dall'inizio del trattamento con terapia antiretrovirale e mantenere tale stato di *undetectability* per tutta la durata dello studio;
- Un unico cambiamento nel regime terapeutico è consentito e solo nel caso esso sia dovuto a motivi diversi dal fallimento terapeutico, quali ad esempio l'intolleranza agli effetti collaterali causati dalla terapia;
- Un singolo *blip* virale è consentito in corso di mantenimento dell'*undetectability*;
- Se pazienti femmine, non essere gravide;
- Avere fornito il consenso informato per la partecipazione allo studio.

I soggetti inclusi sono stati sottoposti a prelievo di campioni ematici, sui quali sono stati misurati lo stato immunologico, inteso come numero di cellule T CD4+/ $\mu$ L, la viremia e la quantità di HIV-DNA, al *baseline* ( $T_0$ ) dopo il raggiungimento dell'*undetectability*, e a tempi successivi ( $T_1$ ,  $T_2$ ).

Il tempo mediano che separa  $T_0$  da  $T_1$  è di 1,5 anni (range 0,5-5); il tempo mediano tra  $T_1$  e  $T_2$  di 3 anni (range 1-6).

## 15.2 Preparazione del campione

Il materiale di partenza sul quale sono state condotte le analisi è costituito da sangue intero dei pazienti, raccolto mediante prelievo endovenoso e fatto pervenire presso il laboratorio di biologia molecolare del Reparto di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova entro 3 ore dal prelievo. Il sangue, contenuto in provette trattate con EDTA come anticoagulante, è stato mantenuto costantemente alla temperatura di +4°C fino al momento della preparazione.

Per ottenere la frazione plasmatica le provette contenenti il campione sono state centrifugate a 1200rpm per 10 minuti e successivamente il plasma è stato aliquotato in volumi di circa 1,5ml e immediatamente congelato a -80°C.

Per ottenere la frazione cellulare di interesse, ovvero le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs), la componente cellulare ottenuta in seguito a centrifugazione è stata risospesa con un opportuno tampone (PBS 1X) e fatta percolare sopra un isovolume del polimero Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Sweden). In seguito a centrifugazione a 1700rpm per 30 minuti, la migrazione differenziale attraverso il polimero ha permesso la formazione di diversi strati contenenti differenti tipologie cellulari [Wottawa *et al.*, 1974].

La frazione cellulare contenente in PBMCs è stata prelevata e trasferita in una provetta pulita per la centrifugazione. Sono quindi stati aggiunti almeno 3 volumi di soluzione salina bilanciata (PBS 1X) e si è proceduto con una centrifugata a 1200rpm per 10 minuti allo scopo di eliminare il surnatante contenente l'eccesso di Ficoll-Paque eventualmente prelevato e gli altri contaminanti (i.e. piastrine) presenti. Tale passaggio è stato ripetuto due volte. I linfo-monociti sono stati stoccati a -80°C, parte in aliquote contate contenenti un pellet di  $1 \times 10^6$  PBMCs e parte in aliquote non contate contenenti siero fetale bovino (FBS) scomplementato e DMSO come agente crioprotettore.

## 15.3 Estrazione di HIV-DNA cellulare

Il DNA cellulare, comprendente tanto il DNA genomico quanto il DNA provirale e il DNA virale non integrato, è stato estratto con il metodo di estrazione Quiagen QUIAmp blood kit delle colonnine a filtro, seguendo le indicazioni fornite dal produttore.

Brevemente, l'aliquota di  $10^6$  PBMCs è stata sospesa in 250  $\mu$ L di PBS e a questi sono stati aggiunti:

-10 µL di sodio dodecil solfato (SDS) 2%

-20 µL di proteasi K

-400 µL di buffer di lisi.

Per lisare le cellule la soluzione è stata incubata in termoblocco per 15 minuti a 56°C, e al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 500 µL di etanolo 96% al fine di far precipitare il DNA.

Il campione è stato trasferito su una colonnina del kit QIAGEN, contenente al suo interno una membrana in grado di trattenere selettivamente l'acido nucleico dopo centrifugazione. Dopo una centrifugata a 8000 rpm per 1 minuto è stato eliminato lo scarto.

Il filtro è stato sottoposto a due lavaggi con 550 µL delle soluzioni di lavaggio AW1 e AW2. La colonnina infine è stata trasferita su una Eppendorf alla quale sono stati aggiunti 100 µL di acqua per diluire il DNA. La provetta è stata centrifugata a 8000 rpm per 60 secondi; il DNA è stato conservato a -20 °C.

#### 15.4 Real Time PCR

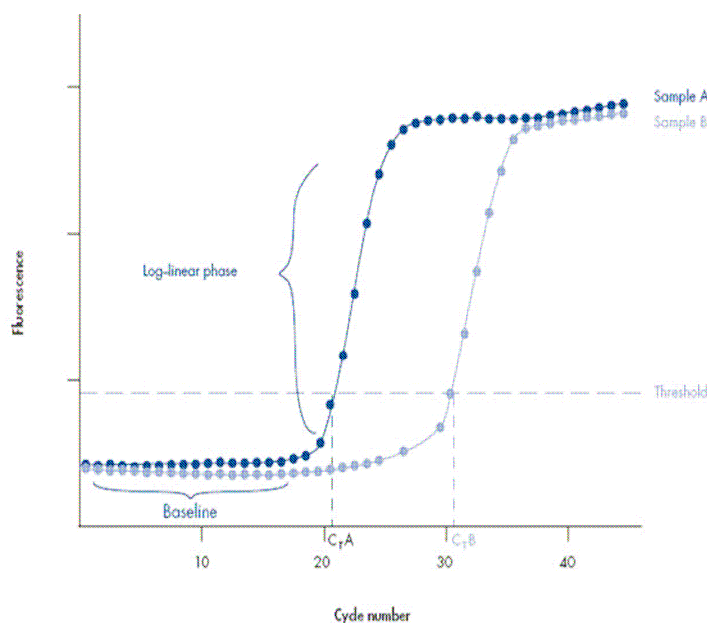
La quantificazione del DNA di HIV presente all'interno del nucleo dei PBMCs isolati dai campioni ematici dei pazienti coinvolti in questo studio è avvenuta per mezzo della Real-Time PCR, ad oggi ritenuta il *gold standard* per la determinazione quantitativa di HIV-DNA [McDermott *et al.*, 1999; Rouizoux *et al.*, 2005; Sarmati *et al.*, 2005].

La metodica di PCR Real-Time, sviluppata per la prima volta all'inizio degli anni '90 [Higuchi *et al.*, 1992], permette contemporaneamente di monitorare *in tempo reale* l'andamento della reazione di amplificazione e di ottenere, tramite l'utilizzo di sistemi appositamente disegnati, una quantificazione accurata del numero di copie dell'amplificato presenti nel campione oggetto di analisi [Tierney *et al.*, 2003; Avettand-Fenoel *et al.*, 2008; Ibanez *et al.*, 1999].

Tutte le prove sono state eseguite utilizzando un sistema di Real-Time PCR che prevede l'utilizzo di sonde TaqMan® (o sonde a idrolisi): tali sonde oligonucleotidiche agiscono legandosi specificamente alla regione *target* ed emettendo un segnale di fluorescenza. Tipicamente, una sonda TaqMan contiene FAM (6-carboxyfluorescein) come *reporter* fluorescente legato covalentemente all'estremità in 5' e TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) legata covalentemente all'estremità 3': quando la sonda si trova libera nella reazione o ibridata alla sua sequenza complementare, l'emissione della fluorescenza è impedita dalla vicinanza del *reporter* al *quencher*; quando avviene la reazione di

polimerizzazione da parte della DNA polimerasi, l'attività esonucleasica dell'enzima idrolizza la sonda, che emette fluorescenza. La crescita dell'indice di fluorescenza ( $\Delta RN$ ) nel tempo – inteso come numero di cicli di amplificazione – segue in scala lineare una curva sigmoide, dove la crescita esponenziale corrisponde all'accumulo di amplificato e il raggiungimento del *plateau* all'esaurirsi dei reagenti. Diventa intuitivo che: maggiore è la quantità iniziale di DNA, prima questo viene rilevato, ovvero il numero di cicli necessari alla sua rilevazione diminuisce.

Sulla curva  $\Delta RN$ /cicli è stabilita arbitrariamente la soglia di specificità (*threshold*) sopra la quale il segnale è ritenuto specifico. Bisogna precisare in effetti che non tutto il segnale corrisponde all'idrolisi della sonda ibridata, ma che alcuni falsi positivi corrispondono ad esempio a rotture aspecifiche delle sonde o a dimeri di *primer* o altro, dando l'impressione di un cosiddetto rumore di fondo, ad indice di fluorescenza tendenzialmente inferiore a quello generato dall'idrolisi delle sonde ibridate. Si definisce ciclo soglia ( $C_t$ ) il numero di cicli al quale l'indice di fluorescenza interseca la *threshold*.



**Figura 4.** ESEMPIO DI AMPLIFICATION PLOT

L'*amplification plot* è la raccolta in tempo reale dei valori di fluorescenza rapportati ai numeri di cicli di amplificazione

Tutte le reazioni di Real-Time PCR sono state effettuate caricando tutti i campioni in duplicato in un volume finale di 25 $\mu$ l, costituiti da 2x Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) contenente l'enzima *HotStart* Taq DNA polimerasi, *primers* e sonde (*Sigma Aldrich*, Germany) e il DNA *target*.

L'amplificazione del gene *target* è stata fatta utilizzando lo strumento ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems): brevemente, 5µl di DNA estratto dai PBMCs dei pazienti arruolati in questo studio sono stati amplificati con il *primer forward* NEC 152 (GCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA) e il *primer reverse* NEC 131 (GGCGCCACTGCTAGAGATTTT) in presenza di una sonda a idrolisi marcata (AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTTRKTGACT) e sottoposti al seguente profilo di amplificazione: 95°C per 10 secondi (denaturazione); 60°C per 30 secondi (ibridazione o *annealing*); 72°C per 30 secondi (estensione); tale profilo viene ripetuto per 45 cicli [Viard *et al.*, 2004].

L'elaborazione dei dati ottenuti è stata effettuata mediante il *software* SDS 3.1 fornito dal produttore dello strumento.

### 15.5 Quantificazione del DNA provirale

Al fine di ottenere una quantificazione dell'HIV-DNA cellulare (provirale ed episomale), ciascuna corsa di Real-Time PCR è stata condotta amplificando in parallelo una curva standard ottenuta mediante diluizioni in base 10 di soluzioni contenenti quantità note di HIV DNA ottenute dalla linea cellulare 8E5 che contiene una copia di HIV-DNA integrato in ogni cellula, con una sensibilità del metodo di 5 copie HIV-DNA/milione di cellule [Christopherson *et al.*, 2000; Desirè *et al.*, 2001, Nicastrì *et al.*, 2008].

L'efficienza della reazione, idealmente vicina al 100%, viene calcolata mediante la misura della pendenza della retta di taratura (*slope*), che deve avvicinarsi a -3,32, e da R<sup>2</sup>, ovvero dal coefficiente di correlazione, che deve avvicinarsi a 1. Importante è anche l'equidistanza dei punti sulla retta.

Persino minime differenze d'efficienza possono modificare drasticamente la quantità rilevata rispetto a quella reale. L'efficienza è essenziale nel calcolo della quantità perché diverse amplificazioni della stessa regione genomica con gli stessi *primer* possono generare diverse quantità di amplicone – ovvero di prodotto d'amplificato – rendendo impossibile risalire dalla quantità finale di DNA a quella iniziale.

L'efficienza viene calcolata secondo la formula:

$$Y = x \cdot (1+E)^n$$

dove:

E = efficienza



Y = numero di prodotti della PCR

x = target iniziale

n = numero di cicli.

Come controllo interno, e ai fini di quantificare l'HIV-DNA in rapporto al numero di cellule, si è proceduto alla quantificazione di una quantità nota di un gene *housekeeping*, ovvero del gene della  $\beta$ -globina o BGL che, considerato il genoma diploide umano, è presente in due copie per cellula.

La quantità di DNA virale, espresso come copie/ $10^6$  di PBMCs, si ricava dalla proporzione:

$$Q_m \text{ copie HIV} : Q_m \text{ copie BGL} = X : 2 \times 10^6$$

dove:

- $Q_m$  = quantità media di copie per pozzetto

-X = quantità di copie di HIV-DNA/  $10^6$  PBMCs

## 15.6 Viremia e stato immunologico

I valori di viremia e stato immunologico ai vari tempi sono stati ricavati da dati ottenuti dalle cartelle cliniche dei singoli pazienti o dal sistema informatico dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Inoltre, una quantificazione accurata dei livelli di HIV RNA in quei pazienti che sono risultati avere una viremia plasmatica non rilevabile con i tradizionali metodi (<20 copie HIV RNA/ml) è stata ottenuta mediante l'impiego di un saggio ultrasensibile con limite di rilevabilità di 2.5 copie HIV RNA/ml descritto in precedenza [Androni *et al.*, 2000; Nicastrì *et al.*, 2008]. I campioni di plasma sono stati raccolti e congelati a  $-80^\circ\text{C}$  entro 6 ore dal prelievo e mantenuti a questa temperatura fino al momento delle analisi.

La viremia residua è stata misurata utilizzando un metodo ultrasensibile basato sul Amplicor HIV-1 Monitor test, Versione 1.5 (Roche Molecular Systems) con alcune modificazioni. Tali modificazioni includono la centrifugazione per ottenere un pellet virale a  $23,600 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  per 2 ore e risospesando il pellet virale in  $50\mu\text{l}$  di diluente. L'intero volume di RNA virale risospeso è stato utilizzato nel saggio di trascrizione inversa e amplificazione mediante PCR seguendo le indicazioni fornite dal produttore dello strumento.

## 15.7 Analisi statistica dei dati

Le seguenti variabili sono state prese in esame: età; conta assoluta e percentuale dei linfociti T CD4+ al *baseline* e al *follow-up*; log<sub>10</sub> delle copie di HIV-DNA/10<sup>6</sup> PBMCs al *baseline* e al *follow-up*; log<sub>10</sub> delle copie di HIV RNA/ml sono stati valutati come variabili continue. I valori di HIV RNA al di sotto del limite più basso di quantificazione (<2.5 copie/ml) al *follow-up*, l'infezione primaria, l'essere straniero, il genere, il fattore di rischio omosessualità e il fattore di rischio tossicodipendenza sono stati valutati come variabili binarie. L'analisi statistica è stata condotta mediante il software Stata (*StataCorp LP*). La popolazione presa in esame è stata valutata con un'analisi bivariata per coppie, allo scopo di descrivere adeguatamente la popolazione ed evidenziare le variabili più utili per future indagini. Quando le variabili accoppiate erano categoriche (binarie) è stato usato il test del  $\chi^2$ , quando era presente 0 in una tabella di contingenza 2x2 è stato usato il Fisher's exact test in luogo del test chi-quadro di Pearson.

Per verificare le capacità predittive dei valori di HIV-DNA al *baseline* sull'evoluzione dei valori di HIV-DNA è stata condotta un'analisi della varianza (ANOVA) sui valori di HIV-DNA al tempo 0 in scala logaritmica (log<sub>10</sub>).

## 16.0 RISULTATI

Alcune delle caratteristiche generali dei 96 soggetti arruolati nello studio sono le seguenti:

- **SESSO:** 76 maschi (79.16%), 20 femmine (20.84%), il rapporto maschi/femmine è pari a circa 4:1;
- **FATTORI DI RISCHIO:** 41 eterosessuali (42.7%), 39 omosessuali (40,7%), 8 dipendenti da droghe iniettive (8.3%), 8 non determinati (8.3%);
- **SOTTOTIPO HIV-1:** 71 B (74%), 25 non-B (26%);
- **INFEZIONE:** 81 infezioni latenti/croniche (84,37%), 14 infezioni primarie (15,63%).

Caratteristica	Tipo	Frequenza assoluta	Frequenza percentuale	Sotto-caratteristica	Frequenza assoluta	Frequenza percentuale
<b>Sesso</b>	Maschi	76	79.16%	Omosessuali	39	40.63%
				Eterosessuali	22	22.92%
				Tossicodipendenti	7	7.29%
				Non determinato	8	8.33%
	Femmine	20	20.84%	Eterosessuali	19	19.8%
				Tossicodipendenti	1	1.03%
<b>Nazionalità</b>	Italiani	80	83.3%			
	Stranieri	16	16.7%			
<b>Sottotipo</b>	B	71	74%			
	Non-B	25	26%			
<b>Infezione</b>	Acuta	14	14.6%			
	Cronica	81	84.3%			
	Dubbia	1	1.1%			

**Tabella 1.** Caratteristiche generali della coorte.

Ai tempi 0, 1 e 2 si sono rilevati i seguenti parametri laboratoristici, trasposti nelle tabelle 2, 3 e 4.

Caratteristica	Mediana	Range
TCD4+ (n° µl)	250	0-810
%TCD4+/TCD8+	14	0-39
Viremia plasmatica (copie/ml)	60000	633-10000000
HIV-DNA (copie/10 <sup>6</sup> PBMCs)	1464	22-20790

**Tabella 2.** Valori rilevati al Tempo 0.

Caratteristica	Mediana	Range
TCD4+ (n°/µl)	530	130-1630
%TCD4+/TCD8+	29	5-50
HIV-DNA (copie/10 <sup>6</sup> PBMCs)	116	5-3323

**Tabella 3.** Valori rilevati al Tempo 1.

Caratteristica	Mediana	Range
TCD4+ (n°/µl)	540	147-1550
%TCD4+/TCD8+	29	5-51.9
HIV-DNA (copie/10 <sup>6</sup> PBMCs)	79	5-1003

**Tabella 4.** Valori rilevati al Tempo 2.

### 16.1 Correlazioni significative tra variabili

Le variabili prese in esame per studiarne le reciproche correlazioni sono distinte in quantitative continue e nominali dicotomiche.

#### QUANTITATIVE CONTINUE:

- Et , espressa in anni;
- Viremia plasmatica, espressa come copie di RNA/mL, al baseline (RNA T<sub>0</sub>);
- Numero assoluto di cellule T CD4+/µL (CD4) ai vari tempi (CD4 T<sub>0</sub>, CD4 T<sub>1</sub>, CD4 T<sub>2</sub>);
- Percentuale di cellule T CD4+ sul numero di linfociti totali, ai vari tempi (CD4% T<sub>0</sub>, CD4% T<sub>1</sub>, CD4% T<sub>2</sub>);
- HIV-DNA, espresso come copie/10<sup>6</sup> PBMCs, ai vari tempi (DNA T<sub>0</sub>, DNA T<sub>1</sub>, DNA T<sub>2</sub>);

#### DICOTOMICHE

- Viremia plasmatica residua a bassa soglia, ovvero <2,5 copie/mL, al tempo 1 e 2 (bsRNA T<sub>1</sub>, bsRNA T<sub>2</sub>), opposta ad una qualsiasi viremia uguale o superiore a questa soglia;
- Sesso femminile (Sesso F) opposto al genere maschile;
- L'origine straniera (Straniero) opposta all'origine italiana;
- Infezione primaria (Primaria) opposta all'infezione cronica;

- Sottotipi HIV-1 non-B (Non-B) opposti al sottotipo B;
- Fattore di rischio *omosessualità* (Omosex) opposto al fattore di rischio *eterosessualità* (Eterosex) e viceversa;
- Fattore di rischio *dipendenza da droghe iniettive* (Tossicodip) opposto alla non dipendenza;

Le correlazioni tra le precedenti variabili e la loro significatività statistica sono illustrate nella Tabella 5. Per verificare l'esistenza di tali correlazioni sono stati condotti un'analisi di regressione lineare, quando almeno una variabile era continua, e il test  $\chi^2$ , quando le variabili erano dicotomiche, e dove appropriato, il test esatto di Fishers.

	age	logRNA	CD4T <sub>0</sub>	CD4%T <sub>0</sub>	logDNAT <sub>0</sub>	CD4T <sub>1</sub>	CD4%T <sub>1</sub>	logDNAT <sub>1</sub>	RNA T <sub>1</sub>	CD4T <sub>2</sub>	CD4%T <sub>2</sub>	logDNAT <sub>2</sub>	RNA T <sub>2</sub>	gender	stranger	primary	sub_nb	riskhete	riskhomo	
age																				
logRNA																				
CD4 T <sub>0</sub>																				
CD4%T <sub>0</sub>			0.0000																	
logDNAT <sub>0</sub>			0.0000																	
CD4T <sub>1</sub>			0.0000	0.0000																
CD4%T <sub>1</sub>				0.0097																
LogDNAT <sub>1</sub>					0.0003															
RNA T <sub>1</sub>	0.0285		0.0257		0.0169			0.0038												
CD4T <sub>2</sub>			0.0000	0.0000		0.0000														
CD4%T <sub>2</sub>	0.0184	0.0423	0.0000	0.0000		0.0000	0.0154			0.0000										
logDNAT <sub>2</sub>					0.0000			0.0000												
RNA T <sub>2</sub>		0.0199			0.0047			0.0143	0.0025				0.0053							
gender	0.008			0.0146		0.0263					0.0176									
stranger	0.0099													0.0000						
primary			0.0037	0.0062			0.0047		0.0141			0.0201								
sub_nb		0.0068					0.0425							0.0004	0.0000					
riskhete														0.0000	0.0000			0.0001		
riskhomo														0.0000	0.0002			0.0001	ND	
risktox																			ND	ND

**Tabella 5.** Analisi delle correlazioni esistenti tra le variabili prese in considerazione. Le variabili sono state sottoposte un'analisi di correlazione per coppie per evidenziare le eventuali correlazioni esistenti nella popolazione considerata. Le correlazioni sono state stabilite per mezzo di analisi di regressione lineare quando almeno una variabile era continua. Quando entrambe le variabile erano categoriche (binarie) è stato usato il test del chi-quadro.



Nella Tabella 5 sono state inserite solo le correlazioni statisticamente significative. Nell'incrocio di una colonna con un riga si ottiene una cella al cui interno è segnato un certo valore di significatività (valore P). La significatività statistica è tale se  $P < 0,05$ , di modo che, al maggior approssimarsi di P a 0,000, la correlazione è maggiore.

Si noti che le correlazioni positive sono segnate in rosso, mentre le correlazioni negative in verde.

Segue un commento delle correlazioni individuate, in ordine di menzione.

**ETÀ:** all'aumentare degli anni, diminuisce la probabilità che il soggetto sia di origine straniera e che sia infetto da un sottotipo non-B, mentre diminuisce la conta percentuale di linfociti CD4+ al tempo 1 e al tempo 2.

**VIREMIA AL BASELINE:** con l'aumentare della viremia al *baseline* ( $T_0$ ), diminuisce la probabilità che il soggetto abbia un ottimale stato immunologico al tempo 0, stato inteso come conta assoluta e percentuale di linfociti CD4+. Di converso aumenta la probabilità che il soggetto sia di origine straniera.

**CD4+ ASSOLUTI AL BASELINE:** l'aumentare della conta assoluta correla positivamente con la conta percentuale al  $T_0$ , con le conte assolute e percentuali dei linfociti CD4+ al  $T_1$  e  $T_2$ ; inoltre aumenta la probabilità che l'infezione sia acuta e che, a  $T_1$ , la viremia plasmatica residua sia inferiore alle 2,5 copie/mL. Esiste infine una correlazione negativa con la viremia al  $T_0$ : ad alti valori dei primi corrispondono bassi valori della seconda e viceversa.

**CD4+ PERCENTUALI AL BASELINE:** anche qui si osserva una correlazione positiva con le conte assolute e percentuali dei linfociti CD4+ al  $T_1$  e  $T_2$ , e con la probabilità di infezione acuta; infine, la conta dei CD4+ al *baseline* possiede una correlazione negativa con la viremia al  $T_0$ , ma con una significatività ancora più alta.

**HIV-DNA AL BASELINE:** alti valori di HIV-DNA al  $T_0$  si accompagnano ad alti valori anche al  $T_1$  e al  $T_2$ . Esiste una correlazione positiva anche con la tossicodipendenza. Gli alti valori al *baseline* rendono più difficile giungere all'evento *bassi valori di viremia plasmatica residua (<2,5 copie/mL)* al  $T_2$ .

**CD4+ ASSOLUTI AL TEMPO 1:** anche qui si osserva una correlazione positiva con le conte assolute e percentuali dei linfociti CD4+ al  $T_0$  e  $T_2$ , e una correlazione positiva con la conta percentuale al  $T_1$ , ma non con la probabilità di infezione acuta.

**CD4+ PERCENTUALI AL TEMPO 1:** si osserva ancora una correlazione positiva con le conte assolute e percentuali dei linfociti CD4+ al  $T_0$  e al  $T_2$ , con la conta assoluta al  $T_1$  e con la probabilità di infezione acuta. Esiste una correlazione inversa con l'età.



**HIV-DNA AL TEMPO 1:** si osserva una correlazione con i valori di HIV-DNA al T<sub>0</sub> e al T<sub>2</sub>; inoltre ad alti valori di HIV-DNA al T<sub>1</sub> si osserva una maggior difficoltà a giungere all'evento *bassi valori di viremia plasmatica residua* (<2,5 copie/mL) al T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>.

**BASSA VIREMIA RESIDUA (<2,5 COPIE/mL) AL TEMPO 1:** l'evento correla positivamente con la bassa viremia plasmatica residua al T<sub>2</sub>, con la probabilità di infezione acuta e con i valori di linfociti CD4+. Come già detto, si osserva una correlazione inversa con i valori HIV-DNA al T<sub>1</sub>.

**CD4+ ASSOLUTI AL TEMPO 2:** alti valori correlano con alti valori di conta percentuale dei linfociti CD4+ al T<sub>2</sub> e alti valori assoluti e percentuali al T<sub>1</sub> e al T<sub>0</sub>.

**CD4+ PERCENTUALI AL TEMPO 2:** ad alti valori si osserva una correlazione con la probabilità di infezione acuta, e ad alti valori di conta assoluta e percentuali di linfociti CD4+ al T<sub>1</sub> e al T<sub>0</sub>. Esiste una correlazione inversa con l'età.

**HIV-DNA AL TEMPO 2:** si noti la correlazione inversa con l'evento *bassa viremia residua* al T<sub>2</sub>. Inoltre: alti valori di HIV-DNA al T<sub>2</sub> correlano con alti valori di HIV-DNA al T<sub>0</sub> e al T<sub>1</sub>.

**BASSA VIREMIA RESIDUA (<2,5 COPIE/mL) AL TEMPO 2:** correla inversamente con i valori di HIV-DNA al T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>, ma positivamente con i valori di bassa viremia residua al T<sub>1</sub>.

**SESSO FEMMINILE:** è più facile che un soggetto femmina sia anche eterosessuale, di origine straniera e infetta da sottotipo non-B.

**ORIGINE STRANIERA:** i soggetti sono più facilmente eterosessuali e affetti da sottotipi non-B, ed è più probabile che abbiano valori superiori di viremia plasmatica al T<sub>0</sub> ed età inferiore rispetto ai soggetti italiani.

**INFEZIONE PRIMARIA:** soggetti con infezione primaria correlano positivamente con i valori di linfociti CD4+, o meglio: con la conta percentuale e assoluta al T<sub>0</sub> e le conte percentuali al T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>. Inoltre si osserva una correlazione con la bassa viremia residua al T<sub>1</sub>.

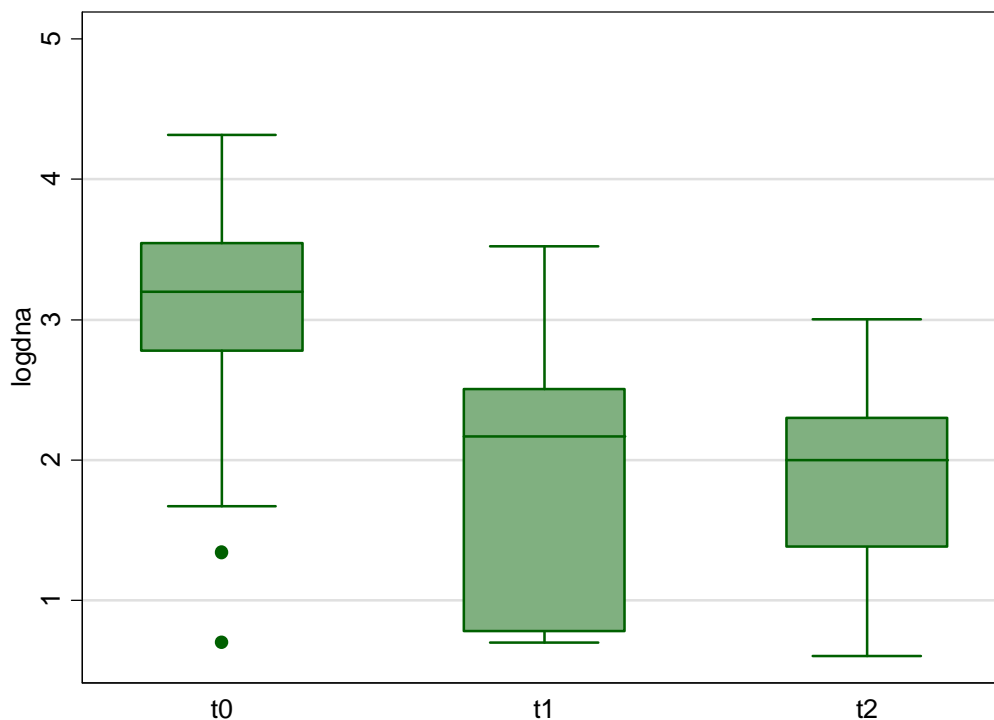
**INFEZIONI DA SOTTOTIPI NON-B:** si osserva una correlazione positiva con l'eterosessualità, l'essere straniero e donna. Di converso, una correlazione negativa con l'età: più si è giovani più è facile essere infetti da sottotipi non-B.  
**ETERO/OMOSESSUALITÀ :** l'essere eterosessuali, come già visto, correla con l'essere donne, l'origine straniera e l'infezione da sottotipi HIV non-B.

## 16.2 Cinetica dei valori di HIV-DNA

L'andamento dei valori di HIV-DNA nel tempo è illustrato di seguito (Tabella 6, Figura 5). Si noti come l'HIV-DNA nella coorte tenda a decadere più rapidamente da  $T_0$  a  $T_1$  che da  $T_1$  a  $T_2$ . Nella Tabella 2 sono indicati i valori non espressi in grafico, in numero di copie/ $10^6$  PBMCs

	Obs	Median	Min	Max
DNA $T_0$	89	1576.5	5	20,790
DNA $T_1$	91	147.0	5	3323
DNA $T_2$	96	100.0	4	1003

**Tabella 6.** HIV-DNA al  $T_0$ ,  $T_1$  e  $T_2$ : valori medi e range. L'ipotesi nulla di un livello costante di DNA ai tre punti di controllo è scartata,  $P=0.0000$  (ANOVA su  $\log_{10}$ DNA per time-point). Il grafico corrispondente è in **Figura 5**, dove media, 95% C.I. e range sono riportati.

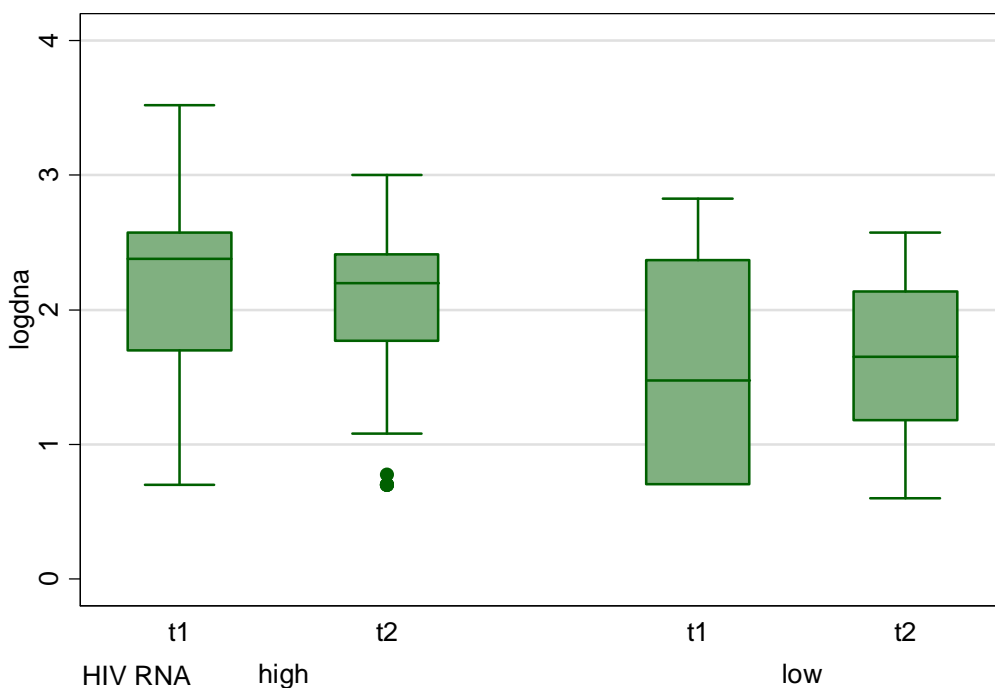


**Figura 5.** Effetto del tempo su HIV-DNA.  $\log_{10}$  di HIV proviral DNA a diversi time-points ( $T_0$ ,  $T_1$  e  $T_2$ ). Media, 95% C.I. e range sono riportati.

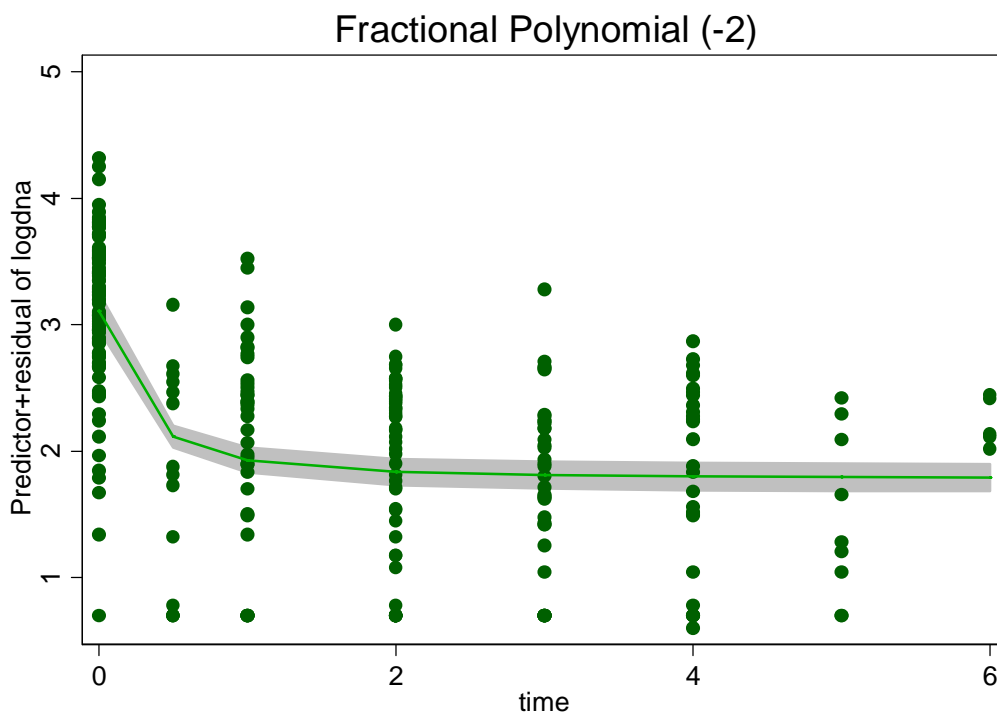
L'andamento dei valori da  $T_1$  a  $T_2$  è stato quindi differenziato a seconda dei livelli di viremia plasmatica (Figura 6). Si noti anzitutto come le due mediane dei valori di DNA

contenute nella categoria *high*, che comprende i pazienti con una viremia  $\geq 2,5$  copie/mL a  $T_1$ , siano sensibilmente superiori alle due mediane della categoria *low* (viremia  $< 2,5$  copie/mL), di circa un ordine di grandezza.

In secondo luogo, si consideri il differente decadimento di HIV-DNA da  $T_1$  a  $T_2$ : all'interno della categoria *low* i valori mediani aumentano da  $T_1$  a  $T_2$ ; avviene l'opposto nella categoria *high*.



**Figura 6.** Valori predittivi della soppressione dell'RNA plasmatico sulla carica di HIV-DNA. Viene preso in considerazione il log<sub>10</sub> di HIV-DNA contro la simultanea carica virale di HIV RNA al T1 e T2. "High" sta per RNA oltre la soglia delle 2.5copie/ml di plasma, "Low" sta per HIV RNA al di sotto di tale soglia. All'analisi della varianza (ANOVA), il log<sub>10</sub> di HIV-DNA è significativamente alto se la carica di HIV RNA eccede la soglia (P=0.0000).



**Figura 7.** Time course del  $\log_{10}$  di HIV-DNA. La quantità di HIV-DNA viene espressa in funzione del tempo.

Si sono dunque considerate le probabilità di ottenere livelli finali (i.e., al tempo 2) di HIV-DNA a partire:

- dalle possibili cinetiche di viremia plasmatica,
- da bassi livelli intermedi di HIV-DNA (ovvero al tempo 1),

al fine di verificare le capacità predittive delle due variabili sui livelli finali di DNA.

		DNA <sub>T2</sub>			
Low RNA T1	Low RNA T2	success	failure	tot	succ%
1	1	9	14	23	39.13%
1	0	2	9	11	18.18%
0	1	7	15	22	31.82%
0	0	8	32	40	20.00%

**Tabella 7.** Influenza della carica di HIV RNA plasmatica al tempo T1 e T2 sui valori di HIV-DNA al T2. La probabilità di spingere la carica di HIV-DNA al di sotto delle 30 copie/106 PBMCs al T2 è espressa come la funzione di raggiungere bassi livelli di HIV RNA al T1 (Low RNA T1) e al T2 (low RNA T2). Il tasso di successo è riportato nella colonna "succ%". Il grafico corrispondente è la Figura 7.

La Tabella 7 descrive quattro possibili percorsi, dove per successo viene intesa la capacità di raggiungere un valore di HIV-DNA al  $T_2 < 30$  copie/ $10^6$  PBMCs per ciascun percorso possibile. I quattro percorsi corrispondono alle quattro differenti possibili cinetiche della viremia plasmatica residua. Agli eventi *viremia plasmatica*  $< 2,5$  copie al tempo 1 e 2 sono associati nelle prime due colonne i numeri 1 o 0, nel caso l'evento venga a verificarsi o meno, rispettivamente.

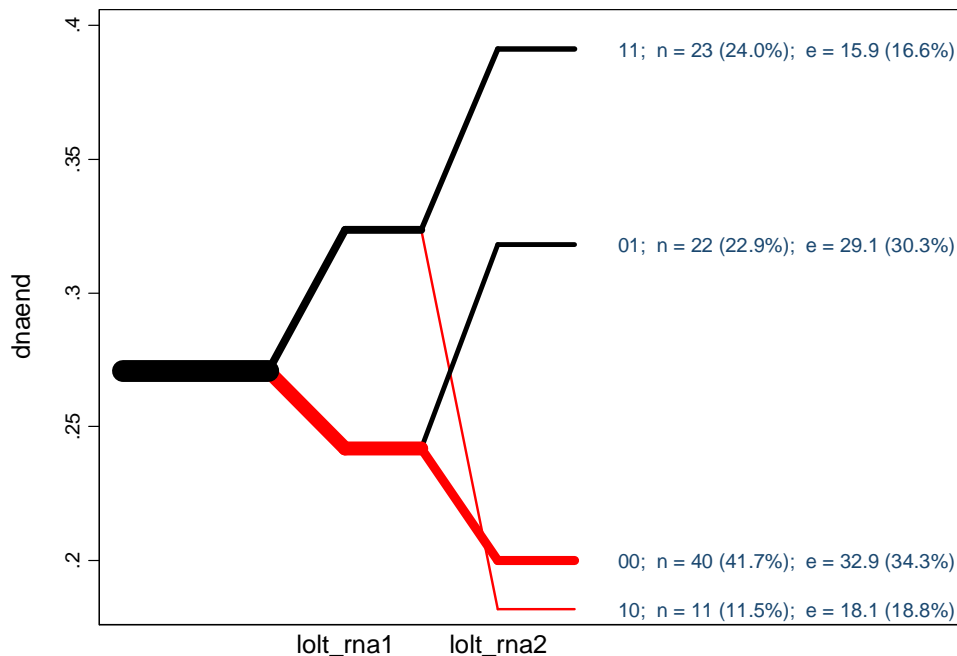
- Nella prima riga è descritta la possibilità di avere a  $T_1$  una viremia plasmatica residua  $< 2,5$  copie/mL, e di mantenerla tale al  $T_2$  (eventi 1;1 cinetica di successo). In questo caso la percentuale di successi è pari a circa il 40%.
- Nel secondo caso la viremia è bassa al  $T_1$  ma è persa al  $T_2$  (eventi 1;0). In altre parole, è avvenuta una risalita della viremia (cinetica di risalita). La percentuale di successi è dell' 18.18%.
- Nella terza riga si ha una viremia alta al  $T_1$  ma una discesa al  $T_2$  (eventi 0;1 – cinetica di discesa). I successi corrispondono al 31.82%.
- Nell'ultimo caso né al  $T_1$  né al  $T_2$  la viremia è mai scesa al di sotto delle 2,5 copie/mL (eventi 0;0 – cinetica di fallimento). La percentuale di successi è pari al 20%.

Si considerino quindi le correlazioni tra gli eventi *HIV-DNA*  $< 30$  copie/ $10^6$  PBMCs al tempo 1 (DNA  $T_1 < 30$ ) e *HIV-DNA*  $< 30$  copie/ $10^6$  PBMCs al tempo 2 (DNA  $T_2 < 30$ ). Dalla seguente Tabella 8 è possibile evidenziare come dopo dei valori di HIV-DNA bassi al tempo 1, la probabilità di mantenere quei valori al tempo 2 è del 42.86%, mentre se i valori sono superiori alle 30 copie/ $10^6$  PBMCs la probabilità di avere valori inferiori è del 20.59%. Ovvero: dopo bassi valori intermedi di HIV-DNA sono più probabili bassi valori finali, di converso è meno probabile che partendo da valori alti si raggiungano bassi valori – per quanto sia stato possibile nel 20.59% dei soggetti.

Per contro, 16 soggetti sui 28 che partivano da bassi valori di HIV-DNA al tempo 1, non sono riusciti a mantenere quei valori sotto la soglia al tempo 2; inoltre, 14 pazienti su 68, sebbene non avessero raggiunto l'evento/successo di ottenere valori inferiori alle 30 copie di HIV-DNA al  $T_1$ , hanno comunque raggiunto il successo al  $T_2$ .

	DNA T1		
DNA T2	YES	NO	Total
yes	12	14	26
no	16	54	70
Total	28	68	96
<b>% of final success</b>	42.86%	20.59%	27.08%

**Tabella 8.** Influenza della carica di HIV-DNA al T1 sui livelli di HOV-DNA al T2. La probabilità di spingere i valori di HIV-DNA sotto le 30 copie/10<sup>6</sup> PBMCs al T2 (DNA T2) è espressa come la funzione di aver raggiunto valori di HIV-DNA sotto le 30 copie al T1 (DNA T1) (Pearson chi<sup>2</sup>= 4.98, P=0.0256).



**Figura 7.** Influenza dei livelli di HIV RNA plasmatici ai tempi T1 e T2 sulla quantità di HIV-DNA al T2. L'asse delle y rappresenta il tasso di successo per ciascuna cinetica (11 successo, 01 risalita, 00 fallimento, 10 discesa); "lolt\_rna1" e "lolt\_rna2" indicano il raggiungimento di livelli non rilevabili (<5cp/ml) di HIV RNA al T1 e T2. La popolazione si divide ai nodi "lolt\_rna1" e "lolt\_rna2": i rami rossi del dendrogramma indicano una cinetica sfavorevole al saggio per HIV RNA su plasma.

Al fine di confermare le capacità predittive dei valori di HIV-DNA al tempo 0 sui valori intermedi (DNA T<sub>1</sub>) e finali (DNA T<sub>2</sub>) di HIV-DNA, già rilevate mediante la correlazione positiva tra queste variabili evidenziata nella tabella 4, è stata condotta un'analisi della varianza (ANOVA) ove l'ipotesi nulla era che, categorizzando la cinetica di decadimento dell'HIV-DNA in 4 possibili percorsi, i valori di HIV-DNA riportati in scala logaritmica (log<sub>10</sub>) rimanessero gli stessi.

Per analogia con le cinetiche di decadimento della viremia plasmatica descritte sopra, si avranno nella Tabella 9 le seguenti cinetiche:

- CINETICA DI FALLIMENTO: se sia a  $T_1$  che a  $T_2$  i valori di HIV-DNA si sono mantenuti  $>30$  copie/ $10^6$  PBMCs.
- CINETICA DI RISALITA: se i valori da  $T_1$  a  $T_2$  sono saliti sopra la soglia delle 30 copie/ $10^6$  PBMCs.
- CINETICA DI DISCESA: se i valori da  $T_1$  a  $T_2$  sono discesi sotto la soglia delle 30 copie/ $10^6$  PBMCs.
- CINETICA DI SUCCESSO: se in entrambi i tempi i valori di HIV-DNA si sono mantenuti  $<30$  copie/ $10^6$  PBMCs.

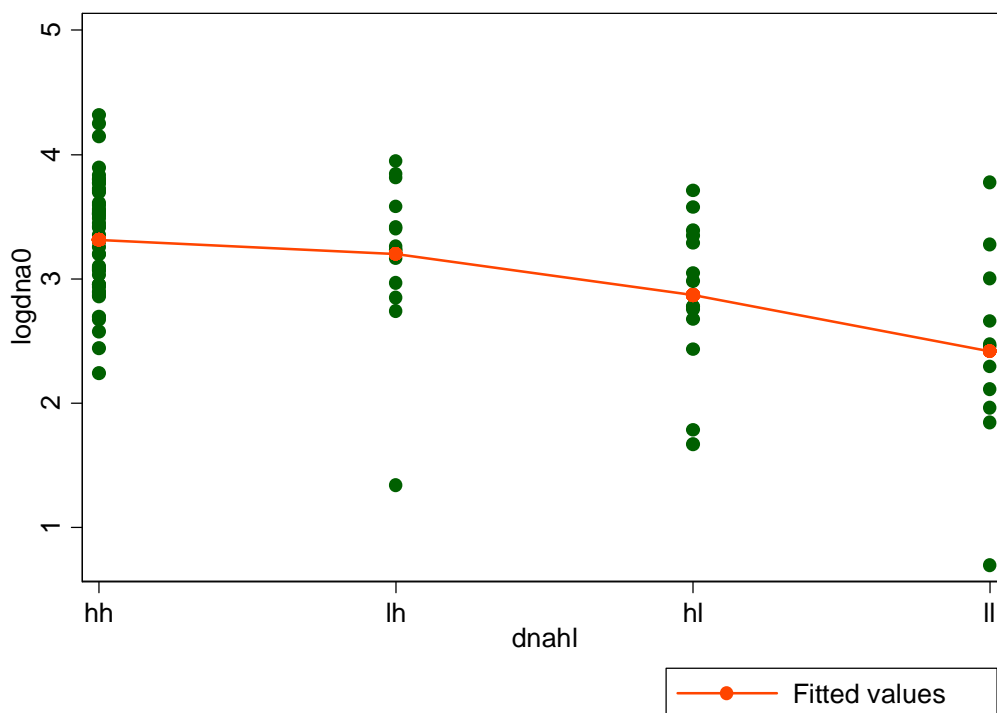
DNA at T0 and T1	DNA at baseline			
	Obs	median	min	max
High-High	50	2403.5	175	20790
High-Low	14	783.5	47	5148
Low-High	14	1774	22	8849
Low-Low	11	286	5	5952

**Tabella 9.** Influenza dei valori di HIV-DNA al baseline sui seguenti valori di HIV-DNA. I pattern di valori di HIV-DNA al T1 e al T2 sono indicati in base al loro livello. Viene riportato il numero delle osservazioni effettuate.

Dalla tabella risulta che, ad esempio, nella cinetica di fallimento, occorsa in 50 soggetti, la media dei valori di HIV-DNA al *baseline* corrisponde a 2403.5 copie/ $10^6$  PBMCs, la deviazione standard a 3540,785 copie/ $10^6$  PBMCs e il range di valori è compreso tra 175 e 17803 copie/ $10^6$  PBMCs.

Si faccia caso come negli 11 soggetti il cui HIV-DNA ha seguito una cinetica di successo la media di valori di HIV-DNA al *baseline* è considerevolmente inferiore a quella delle altre cinetiche.

Tutto questo risulta più evidente dalla seguente Figura 8.



**Figura 8.** Influenza dei valori di HIV-DNA al baseline sui seguenti valori di HIV-DNA a diversi time-points. Il log10 di HIV-DNA è riportato sull'asse delle y; il pattern di evoluzione del DNA sull'asse delle x. Il pattern di HIV-DNA al T1 e T2 è riportato dalla coppia delle lettere "h" o "l", che si riferiscono a alti o bassi livelli ai due diversi timepoints, rispettivamente. L'ipotesi nulla di quantità di HIV-DNA costanti nel tempo è rifiutata ( $P=0.0000$ ).

L'analisi della varianza ha rigettato l'ipotesi nulla ( $P=0,0004$ ). In altre parole, i valori in scala logaritmica di HIV-DNA raccolti al *baseline*, categorizzati secondo le 4 possibili cinetiche di decremento, non sono gli stessi tra le quattro categorie.

La Tabella 9 riassume i dati relativi all'influenza dell'aver cominciato la terapia antiretrovirale in corso di infezione primaria sui livelli di HIV-DNA nel corso del tempo.

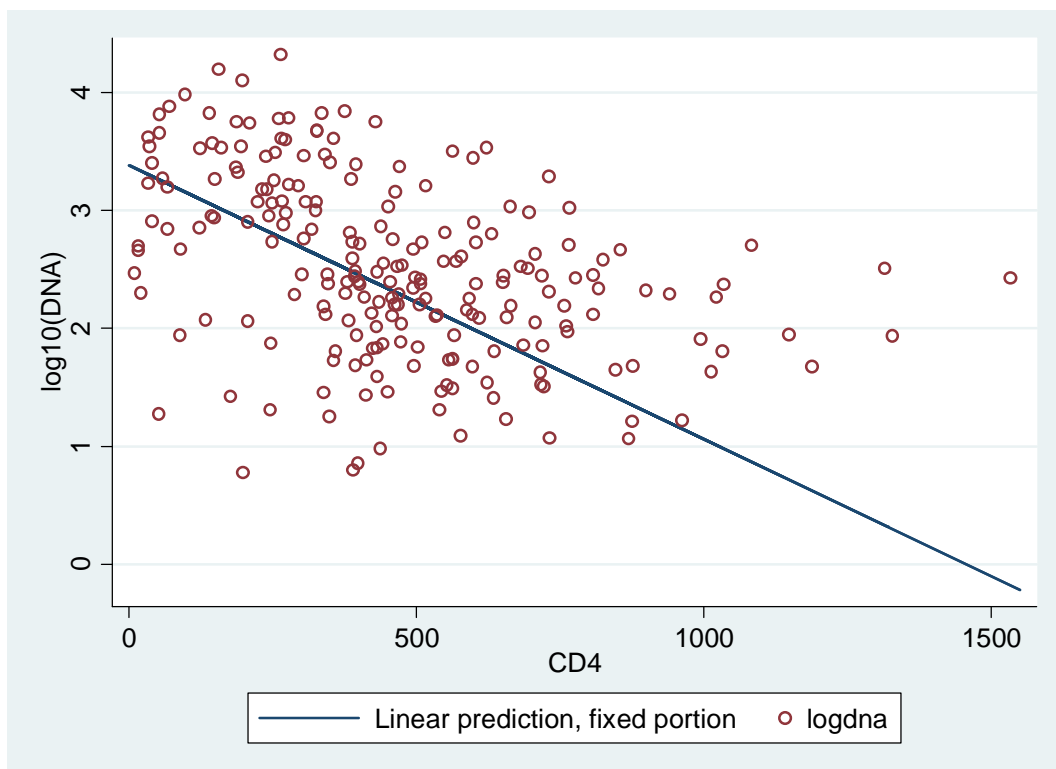
HIV-DNA T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub>	PRIMARY			
	0	1	Total	Prop%
High-High	43	3	46	6.52%
High-Low	10	3	13	23.08%
Low-High	11	2	13	15.38%
Low-Low	6	4	10	40.00%
Total	70	12	82	14.63%

**Tabella 9.** Influenza dell'infezione recente da HIV sull'andamento dei valori di HIV-DNA.



Anche in questo caso, in analogia con quanto riportato sopra, vengono considerate quattro diverse cinetiche di andamento dei livelli di HIV-DNA (fallimento o “High-High”, risalita o “Low-High”, discesa o “High-Low”, e successo o “Low-Low”) a due diversi tempi di controllo (DNA T1-T2) espresse in funzione della variabile “essere in corso di infezione acuta” (*primary*) o “non essere in corso di infezione acuta” (rispettivamente 1 e 0) al momento dell’inizio della terapia antiretrovirale.

Si può notare come la cinetica più favorevole di andamento del DNA virale cellulare (Low-Low) sia associata alla maggiore proporzione di pazienti con infezione primaria.



**Figura 9.** Correlazione tra la quantità di HIV-DNA e i CD4 nel sangue periferico.

E' stata inoltre condotta un'analisi di regressione lineare per evidenziare eventuali correlazioni tra la quantità (espressa in log10) del DNA virale cellulare e la conta dei linfociti T CD4+. Dai dati raccolti emerge una correlazione negativa tra le due variabili ( $P=0.0000$ ) (Figura 9).

Allo scopo di determinare se vi fossero correlazioni tra la cinetica del DNA virale e il trattamento farmacologico iniziale, si sono considerate le probabilità di ottenere bassi livelli di HIV-DNA a due diversi *time-points* ( $T_1$  e  $T_2$ ) in base all'utilizzo selettivo di una determinata terapia antiretrovirale. Come si può notare dalla Tabella 10 e dalla Tabella 11,

la Nevirapina, con un picco di frequenza corrispondente alla cinetica di discesa (DNA T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>: hl) mostra una frequenza favorevole maggiore rispetto a Efavirenz e ai PI. Allo stesso modo, si può notare una correlazione tra l'utilizzo della Nevirapina, associata ad altri farmaci, nella terapia antiretrovirale e la probabilità di raggiungere al T<sub>2</sub> livelli di HIV-DNA inferiori ai limiti di rilevabilità (30 copie/10<sup>6</sup> PBMCs) stabiliti da questo studio.

DNA T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub>	efavirenz	%	nevirapine	%	PI	%	other	%	Total
High-High	21	55.26%	5	35.71%	27	65.85%	0	0.00%	53
Low-High	9	23.68%	1	7.14%	6	14.63%	0	0.00%	16
High-Low	4	10.53%	6	42.86%	3	7.32%	0	0.00%	13
Low-Low	4	10.53%	2	14.29%	5	12.20%	1	100.00%	12
Total	38	100.00%	14	100.00%	41	100.00%	1	100.00%	94

**Tabella 10.** Effetto del trattamento iniziale sul conseguente *time course* di HIV-DNA. Il pattern di evoluzione di HIV-DNA è associato a differenti frequenze di distribuzione dei pazienti in accordo al tipo di farmaco usato nella terapia.

DNA T <sub>2</sub>	efavirenz	%	nevirapine	%	PI	%	other	%	Total
no	30	78.95%	6	42.86%	33	80.49%	0	0.00%	69
yes	8	21.05%	8	57.14%	8	19.51%	1	100.00%	25
Total	38	100.00%	14	100.00%	41	100.00%	1	100.00%	94

**Tabella 11.** Effetto del trattamento iniziale sulle quantità di HIV-DNA al Tempo 2. La probabilità di ottenere livelli di HIV-DNA < 30 copie/10<sup>6</sup> PBMCs è espressa come funzione del tipo di farmaco utilizzato nella terapia.

## 17.0 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi sono stati analizzati i risultati ottenuti dallo studio di una coorte di pazienti seguiti longitudinalmente al fine di determinare l'influenza dell'evoluzione immunologica e virologica, soffermando l'attenzione sulla carica virale di HIV-DNA e sulle sue correlazioni con l'andamento della terapia antiretrovirale. Numerosi dati, infatti, evidenziano come i livelli di DNA provirale persistano per lunghi periodi di tempo, rappresentando il *reservoir* reale dell'infezione, a dispetto delle terapie attualmente applicate [Ylmaz, 2001; Pomerantz 2002]. La valutazione quantitativa del DNA provirale diventa quindi un obiettivo di grande interesse che può avere delle ripercussioni nella valutazione della terapia e nella comprensione dell'evoluzione dell'infezione.

Segue una discussione sui risultati ottenuti dall'analisi delle caratteristiche della coorte.

Come si è visto, all'interno della coorte prevalgono i soggetti maschi e la metà di questi ha come fattore di rischio di trasmissione d'infezione l'omosessualità, mentre, tra le donne, gli unici fattori di rischio rilevati corrispondono all'eterosessualità e alla dipendenza da droghe iniettive.

Il sottotipo HIV maggiormente prevalente è il B, e gran parte dei soggetti sono stati arruolati in corso di infezione latente/cronica.

Dal punto di vista dello stato immunologico dei pazienti si può notare come alti valori assoluti e percentuali di linfociti CD4+ tendano a mantenersi tali nel tempo, per il fatto che, a parità di velocità di decremento, soggetti con un patrimonio immunitario superiore partono avvantaggiati rispetto a soggetti con un patrimonio inferiore. Ed è noto sia in letteratura che nella pratica clinica come esista una relazione inversa tra lo stato immunologico e la viremia plasmatica, proprio per la ragione che la replicazione virale depaupera il patrimonio immunitario [Mellors *et al.*, 1996; Rong *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2004].

I risultati esposti evidenziano come, in effetti, le conte assolute e percentuali di linfociti CD4+ ai tempi 0, 1 e 2 siano correlate tra loro. Dai risultati emerge anche una relazione inversa tra le conte percentuali a T<sub>1</sub> e a T<sub>2</sub> e l'età dei soggetti. In altre parole, più il soggetto è anziano, più il suo patrimonio di linfociti CD4+ è ridotto in rapporto al numero totale di linfociti. Ciò richiama il fatto, assai noto nella pratica clinica, di come l'età riduca la resistenza alle infezioni [Gregg *et al.*, 2005].

Per quanto riguarda i dati relativi alla quantificazione del DNA virale, la quantità rilevata di HIV-DNA iniziale è compatibile con gli studi presenti in letteratura [Goujard *et al.*, 2006; Rouizoux *et al.*, 2005; Burgard *et al.*, 2009; Masquelier *et al.*, 2011].

La cinetica dei valori di HIV-DNA offre spunti interessanti: in studi precedenti la velocità di decremento dei valori di HIV-DNA era stata associata alla durata della terapia antiretrovirale altamente efficace [Sarmati *et al.*, 2005; De Rossi *et al.*, 2002; Ngo-Giang-Huong *et al.*, 2001].

In questo studio in effetti, viene rigettata l'ipotesi che i valori di HIV-DNA si mantengano costanti nel corso dell'HAART.

Altrove si era notato come la cinetica di decadimento fosse bifasica: nei primi 3 mesi di terapia veniva registrata un'alta velocità di decremento, seguita da una seconda fase caratterizzata da velocità inferiore, con un'emivita di HIV-DNA di 6,6 mesi [Yerly *et al.*, 2000].

Dai risultati esposti in questo studio, si evince in effetti come la velocità di decremento sia maggiore da  $T_0$  a  $T_1$  che da  $T_1$  a  $T_2$ , anche se, ricordiamo, il tempo mediano di campionamento di  $T_1$  corrisponde a 1,5 anni, ovvero a 18 mesi. Questo significa che questo studio non può confermare il dato dei 3 mesi come soglia oltre la quale la velocità di decremento diminuisce, ma tendenzialmente conferma una cinetica bifasica di decremento.

Dalla Figura 6 emerge un altro dato interessante: da  $T_1$  a  $T_2$  i pazienti della categoria di viremia *low* (ovvero viremia  $<2,5$  copie/mL a  $t_1$ ) aumentano i valori mediani di HIV-DNA, per quanto sia possibile vedere che a  $T_1$  i valori siano più dispersi che a  $T_2$ .

Dalla medesima figura si nota poi che le due mediane dei valori di DNA contenute nella categoria di viremia *high*, siano sensibilmente superiori alle due mediane della categoria *low*, di circa un ordine di grandezza. Questo significa che i soggetti con una viremia superiore possedevano una quantità di HIV-DNA maggiore di circa 10 volte rispetto ai soggetti con viremia inferiore, e ciò si riflette sulla correlazione positiva tra valori di HIV-DNA e valori di viremia plasmatica residua, che verrà commentata in seguito.

Abbiamo visto che la probabilità di ottenere livelli di HIV-DNA inferiori alle 30 copie/ $10^6$  PBMCs è maggiore nel caso la viremia venga mantenuta al di sotto delle 2,5 copie/mL in entrambi i punti del follow-up (cinetica di successo).

Traducendo il dato nei campi della patologia e della clinica, ciò significa che il *reservoir* virale tende a decadere se non rifornito da una replicazione (viremia) costante, per il lento ma inesorabile *turn over* degli elementi che lo costituiscono [Siliciano *et al.*, 2003].

Inaspettatamente, nel caso di una risalita della viremia da livelli  $<2,5$  copie/mL a valori superiori, la probabilità di ottenere bassi valori di HIV-DNA è addirittura inferiore, persino la metà circa, a quella che si ottiene nei casi ove non si è mai raggiunta una viremia  $<2,5$  copie. In altre parole, la cinetica di fallimento ha probabilità doppia di ottenere bassi livelli di HIV-DNA rispetto alla cinetica di risalita. Eppure, al contrario di quest'ultima, la cinetica di fallimento non ha mai ottenuto bassi livelli di viremia.

La probabilità invece di raggiungere bassi valori di HIV-DNA nei casi in cui non si siano mai raggiunti bassi valori di viremia (cinetica di fallimento), e quella nei casi dove i bassi valori si siano raggiunti solo al  $T_2$  (cinetica di discesa), sono numericamente vicine (20%, 18.18%, rispettivamente).

Assieme queste osservazioni indicano che la probabilità del *reservoir* virale di decadere è stabilita in maniera decisiva ad un livello precoce, almeno al primo punto di *follow-up*, la cui mediana in questo studio, ricordiamo, corrisponde a 1,5 anni (range 0,5-5 anni ).

Forse nel caso della cinetica di risalita la probabilità sensibilmente inferiore potrebbe essere determinata dalla risalita sia della viremia quanto del *reservoir* virale, mentre nelle cinetiche di fallimento e di discesa, la probabilità è maggiore in quanto i valori di viremia e i valori di DNA si comporterebbero indipendentemente l'uno dall'altro, pur con una certa correlazione positiva. Ad esempio, in una popolazione di soggetti con pari dimensioni del *reservoir* virale, la viremia varierebbe a seconda della replicazione virale o, viceversa, in una popolazione con medesima viremia, varierebbero le dimensioni del *reservoir*.

Tutto ciò a patto di rimanere a bassi valori di replicazione. La disgiunzione tra i valori dell'una e dell'altro scomparirebbe infatti durante la risalita della viremia, che è conseguenza di una replicazione più vivace.

Studi ulteriori confermeranno o meno questa ipotesi, per quanto già nello studio di Sarmati *et al.* venisse posta l'attenzione sul fatto che 163 pazienti con viremia plasmatica persistentemente *undetectable* in TARV efficace avessero quantità variabili di HIV-DNA, a parità quindi di *undetectability*.

L'analisi della varianza dei valori di HIV-DNA, raccolti al *baseline* e riportati in scala logaritmica ( $\log_{10}$ ), ha rigettato ( $P=0,0004$ ) l'ipotesi nulla secondo la quale i suddetti valori, categorizzati secondo 4 categorie di decremento dell'HIV-DNA, fossero uguali tra le 4 categorie.

Mettendo in relazione i valori di HIV-DNA al  $T_0$  con le 4 cinetiche di decremento dell'HIV-DNA si può notare come i valori più bassi di HIV-DNA al *baseline* corrispondano alla

cinetica di decremento più favorevole, ovvero quella di successo (HIV-DNA <30 copie/10<sup>6</sup> PBMCs in entrambi i punti di *follow-up*).

Ciò significa che è possibile predire, in base ai valori iniziali di HIV-DNA, l'evoluzione di quei valori.

Da studi precedenti era noto come l'HIV-DNA correlasse con lo zenit viremico e inversamente con il nadir immunologico [Verhofstede *et al.*, 1994; Burgard *et al.*, 2009], e in effetti, i risultati di questo studio confermano questa ipotesi.

Bisogna tuttavia precisare che se lo studio di Burgard *et al.* è uno studio trasversale caso-controllo, questo studio è longitudinale, e inserisce la variabile temporale di modo da evidenziare l'evoluzione delle correlazioni nei diversi tempi di *follow up*. Inoltre nello studio di Burgard sono stati arruolati anche soggetti non naïve.

Questo studio sottolinea una correlazione inversa tra HIV-DNA e stato immunologico e una correlazione positiva tra HIV-DNA e viremia plasmatica che si mantengono nel tempo dello studio.

Di più: la correlazione inversa tra evento *bassi valori di viremia residua (<2,5 copie/mL) al tempo 2* e valori di DNA è maggiore con i valori di DNA del tempo 2 rispetto a quelli del tempo 1 e 0 (P=0,0027, rispetto a 0,0228 e 0,0235). Il che significa che la probabilità di raggiungere bassi livelli di viremia è maggiore se al tempo 2 si hanno bassi livelli di DNA. In effetti il fatto che al tempo 0 i livelli di DNA correlino inversamente con l'evento *bassa viremia al tempo 2* suggerisce che sia possibile predire già in fase pre-terapeutica se grossomodo 3 anni più tardi il paziente raggiungerà o meno l'*undetectability*, a partire dal suo livello *vaseline* di HIV-DNA.

Questo conferma l'utilità dell'HIV-DNA come marcatore prognostico di malattia, come già era stato proposto, anche in virtù delle sue forti correlazioni con altri parametri laboratoristici già utilizzati nella pratica clinica.

Inoltre, lo studio delle correlazioni tra variabili evidenzia come i valori di HIV-DNA siano correlati positivamente tra loro ai tempi 0, 1 e 2: se ad esempio un soggetto parte con un *reservoir* cospicuo, è facile che, a parità di velocità di decremento, lo mantenga superiore a quello di un soggetto con un *reservoir* inferiore. Inoltre questo studio dimostra che le uniche variabili che correlano con i valori di HIV-DNA sono gli eventi *bassa viremia (<2,5 copie/mL) al tempo 1 e 2*.

Tutte le altre variabili, quali ad esempio il genere, la nazionalità del soggetto e la viremia al tempo 0, non producono correlazioni statisticamente significative.

Si noti anche l'inaspettata correlazione esistente tra i valori di HIV-DNA al tempo 0 e la dipendenza da droghe iniettive. Tale correlazione non dovrebbe esistere, ipotizzando a priori che i valori del *reservoir* virale dipendano esclusivamente da fattori virali e genetici costitutivi. Per una qualche ragione, i tossicodipendenti hanno valori significativamente più alti di HIV-DNA al *baseline*, significatività che si perde ai punti 1 e 2. Probabilmente quel regime di vita consente in qualche modo al virus di costruire un *reservoir* più importante, per lo meno in fase preterapeutica.

Questo dato non compare in letteratura, per quanto non siano noti degli studi comparativi tra quantità di HIV-DNA in soggetti dipendenti e quantità di HIV-DNA in soggetti non dipendenti, ma si presti attenzione anche al fatto che molte variabili non sono state considerate, quali ad esempio la possibilità di coinfezioni, particolarmente frequenti in questa categoria a rischio, oltre al fatto che dal numero relativamente piccolo di soggetti tossicodipendenti è difficile indurre un'inferenza statistica.

Abbiamo poi visto che la condizione di infezione acuta correla positivamente con i valori di linfociti CD4+, o meglio, con la conta percentuale e assoluta al  $T_0$  e le conte percentuali al  $T_1$  e  $T_2$ . Tradotto in termini clinici, significa che i pazienti con infezione acuta posseggono al *baseline* valori assoluti e percentuali di linfociti CD4+ superiori a quelli dei soggetti con infezione latente. Mentre, durante il *follow up*, il vantaggio dei pazienti arruolati e trattati nel corso dell'infezione acuta è quello di avere percentuali superiori di cellule T CD4+, rapportate al numero di linfociti totali. Chiaramente, considerando che ai fini del controllo generale del sistema immunitario, i linfociti CD4+ sono più centrali rispetto ai linfociti CD8+ [MacLeod *et al.*, 2010], se ne deduce che durante tutti i tre tempi di campionamento i pazienti trattati già a partire dall'infezione acuta posseggono e mantengono un miglior stato immunologico.

Sono state poi osservate altre correlazioni significative tra le variabili prese in considerazione: come già visto, l'essere eterosessuali è significativamente correlato positivamente all'essere di origine straniera, di sesso femminile e all'essere infetti da sottotipi HIV non-B. Viceversa, all'omosessualità è correlata l'origine italiana, il sesso maschile e il sottotipo B. Tuttavia si è visto come tali variabili non influiscano significativamente sui parametri laboratoristici presi in esame.

La variabile *età* merita una menzione a parte. Si è visto che all'aumentare degli anni diminuisce la probabilità che il soggetto sia di origine straniera e che sia infetto da un sottotipo non-B, mentre diminuisce la conta percentuale di linfociti CD4+ al tempo 1 e al tempo 2.

La diminuzione di percentuale di linfociti CD4+ è già stata commentata come il risultato dell'indebolimento delle difese immunitarie all'aumentare dell'età. Si noti invece come le due variabili *origine straniera* e *sottotipi non-B* siano invariabilmente correlate. Il fenomeno è spiegato dal fatto che molti soggetti di origine straniera sono infetti da sottotipi HIV non-B e che il sottotipo B sia il più frequente nella realtà italiana, ma non altrettanto importante nelle altre nazioni, soprattutto in quelle scarsamente industrializzate.

Il presente lavoro evidenzia inoltre come il trattamento iniziale con una terapia combinatoria contenente efavirenz sia virologicamente inferiore ad un regime terapeutico che contiene nevirapina: tale dato conferma studi precedenti nei quali veniva evidenziato come l'uso di NNRTIs avesse un effetto migliore sulla viremia residua rispetto all'uso di PIs [Bonora *et al.*, 2009; Nicastri *et al.*, 2008] e viene anche confermato il miglior effetto della nevirapina rispetto ad efavirenz [Haim-Boukobza *et al.*, 2010].

Infine i limiti di questo studio: un primo limite è la difficoltà tecnica a distinguere il DNA provirale dal DNA virale non integrato: la metodica di estrazione del DNA descritta impedisce questa discriminazione. Ad ogni modo è già stato dimostrato come la stima dell'HIV-DNA totale corrisponda alla stima del DNA provirale [Koelsch *et al.*, 2008; Chomont *et al.*, 2009, Watanabe *et al.*, 2011].

Un secondo limite è la relativamente bassa numerosità campionaria di pazienti trattati con diversi regimi terapeutici. Un terzo limite è dato dal fatto che sono state testate solo le correlazioni tra le variabili già elencate.

In conclusione, questo studio longitudinale della valutazione della quantità di HIV-DNA cellulare e della viremia plasmatica residua di HIV in soggetti naïve trattati con terapia antiretrovirale efficace rafforza ipotesi già note in letteratura, quali i valori mediani di HIV-DNA al *baseline*, la cinetica bifasica di decadimento dei valori di HIV-DNA, le correlazioni tra HIV-DNA e bassa viremia plasmatica residua, la possibilità di usare i valori di HIV-DNA al *baseline* per predire il raggiungimento o meno dell'*undetectability* in un tempo mediano di tre anni, l'ipotesi che pazienti trattati a partire dalla condizione clinica di infezione acuta HIV posseggano e mantengano un miglior stato immunologico.

Lo studio fornisce nuovi dati: i maggiori valori di HIV-DNA al *baseline* dei soggetti dipendenti da droghe iniettive, le probabilità di ottenere bassi valori di HIV-DNA a partire da diverse cinetiche dei valori di viremia residua, la possibilità di predire l'evoluzione al *follow-up* dei valori di HIV-DNA a partire dai valori di questo raccolti al *baseline*.

Tutto questo contribuisce a rafforzare la convinzione che l'HIV-DNA possa essere considerato un marcatore utile nella valutazione dell'evoluzione dell'infezione da HIV.



Questo studio tuttavia presenta alcuni limiti: la bassa numerosità campionaria, il non aver considerato possibili correlazioni dei parametri esaminati con altri parametri laboratoristici, il non distinguere il DNA virale integrato dal non integrato.

Nell'immediato futuro sarà necessario aumentare la numerosità campionaria e considerare ulteriori variabili nelle statistiche, quali ad esempio, la possibilità di co-infezioni (HCV, HBV, etc.).

## 18.0 BIBLIOGRAFIA

- Agostini I, Popov S, Hao T, Dubrovsky L, Chaika O, Chaika N, Lewis R, Bukrinsky M, 2002. *Phosphorylation of Vpr regulates HIV type 1 nuclear import and macrophage infection. AIDS Res Hum Retroviruses* 18 (4):283-288
- Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D, 1994. *Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membraneproximal CD4 cytoplasmic domain. Cell* 11;76 (5): 853-864
- Alexaki A, Liu Y, Wigdahl B, 2008. *Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. Curr HIV res*, 6 (5): 388-400.
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA, 1996. *CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophagw-tropic HIV-1. Science* 272:1955-1958.
- Andreoni M, Parisi SG, Sarmati L, Nicastrì M, Ercoli L, Mancino G, Sotgiu G, Mannazzu M, Trevenzoli M, Tridente G, Concia E, Aceti A, 2000. *Cellular proviral HIV-DNA decline and viral isolation in naive subjects with <5000 copies/ml of HIV-RNA and >500 x 10<sup>6</sup> CD4 cells treated with highly active antiretroviral therapy. AIDS*, 14: 23-29.
- Avettand-Fenoel V, Boufassa F, Galimand J, Meyer L, Rouzioux C, 2008. *HIV-DNA for the measurement of the HIV reservoir is predictive of disease progression in seroconverters whatever the mode of result expression is. J Clin Virol*, 42: 399-404.
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L, 1983. *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science* 220 (4599): 868–871
- Birkus G et al, 2002. *Assessment of mitochondrial toxicity in human cells treatedh tenofovir: Comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother*. 46:716-723.
- Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF, 2002. *The challenge of viral reservoirs in HIV infection. Annu Rev Med*, 53: 2508-2518.
- Bonora S, et al. 2009. *Ultrasensitive assessment of residual HIV viraemia in HAART-treated patients with persistently undetectable plasma HIVRNA: a cross-sectional evaluation. J. Med. Virol*. 81:400–405.
- Brown PO, 1997. Integration. In Coffin JM, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Laboratory Press.161-203.
- Bru-Vezinet F., Simon F. *Diagnostic tests for HIV infection*. In: Armstrong D., Cohen J., editors. *Infectious Diseases*. London: Mosby, 5.23.1-10.-03, 1999.
- Burgard M, Boufassa F, Viard JP, Garrique I, Ruffault A, Izopet J, Vabret A, Descamps D, Colson P, Seigneurin JM, Rouzioux C; ANRS AC11 Working Group: *Factors influencing*

*peripheral blood mononuclear cell-associated HIV-1 DNA level after long-term suppressive antiretroviral therapy in 236 patients.* AIDS 2009; 23(16): 2165-2171

Burton CT, Nelson MR, Hay P, Gazzard BG, Gotch FM, Imami N, 2005. *Immunological and virological consequences of patient-directed antiretroviral therapy interruption during chronic HIV-1 infection.* Clin Exp Immunol, 142 (2): 354-361.

Carr A, 2003. *Lactic acidemia in infection with human immunodeficiency virus.* Clin Infect Dis. 36:S96-100.

Cassol SA, Lapointe N, Salas T, Hankins C, Arella M, Fauvel M, Delage G, Boucher M, Samson J, Charest J, 1992. *Diagnosis of vertical HIV-1 transmission using the polymerase chain reaction and dried blood spot specimens.* J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. 5 (2) : 113-119.

Chawla A, Murphy G, Donnelly C, Booth CL, Johnson M, Parry JV, Philips A, Geretti M, 2007. *Human Immunodeficiency Virus (HIV) antibody avidity testing to identify recent infection in newly diagnosed HIV type 1 (HIV-1)-seropositive persons infected with diverse HIV-1 subtypes.* Journal of Clinical Microbiology, 45 N<sup>o</sup>3, 415-420 .

Chevret S, Kirstetter M, Mariotti M, Lefrère F, Frottier J, Lefrère JJ, 1994. *Provirus copy number to predict disease progression in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection.* The Journal of infectious diseases 169 (4): 882-885.

Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel MR, Ghattas G, Brenchley JM, Schacker TW, Hill BJ, Douek DC, Routy JP, Haddad EK, Sékaly RP, 2009. *HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation.* Nature medicine, 15 (8): 893-900.

Chowdhury IH et al 2003. *HIV-1 Vpr activates cell cycle inhibitor p21/Waf1/Cip1: a potential mechanism of G2/M cell cycle arrest.* Virology 305 (2): 371-377.

Chun TW, Finzi D, Margolik J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF, 1995. *In vivo fate of HIV-infected T cells : quantitative analysis of the transition to stable latency.* Nat Med 1: 1284-1290.

Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, Di Giuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolik J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Siliciano RF, 1997(1). *Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV infection.* Nature 387: 183-188.

Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, Lloyd AL, Nowak MA, Fauci AS, 1997(2). *Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy.* Proc Natl Acad Sci, 94: 13193-13197.

Chun TW, Engel D, Berry MM, 1998. *Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4+ T cells during primary HIV-1 infection.* Proc Natl Acad Sci, 95: 8869-8873.

Chun TW, Davey RT, Ostrowsky M, Shawn Justement J, Engel D, Mullins JI, Fauci AS, 2000. *Relationships between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active antiretroviral therapy.* Nat Med, 6: 757-761.

Chun TW, Justement JS, Lempicki RA, 2003. *Gene expression and viral production in latently infected, resting CD4+ T cells in viremic versus aviremic HIV-infected individuals.* Prot Natl Acad Sci, 100: 1908-1913.

Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Large D, Semerjian A, Curlin ME, O'Shea MA, Hallahan CW, Daucher M, Ward DJ, Moir S, Mullins JI, Kovacs C, Fauci AS, 2005. *HIV-1 infected individuals receiving highly active antiretroviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir.* J Clin Invest, 115 (11): 3250-3255.

Clapham PR, Weiss RA, 1997. *Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors.* Nature. 388(6639):230-1.

Clavel F, Hange AJ, 2004. *HIV drug resistance.* N Engl J Med. 350 (10):1023-1035.

Clementi M, 2000. *Quantitative analysis of virus expression and replication.* J Clin Microbiol, 38: 2030-2036.

Cohen EA, Subbramanian RA, Gottlinger HG, 1996. *Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis.* Curr. Top. Microbiol. Immunol. 214: 219-235.

Coffin JM, 1995. *HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy.* Science 27;267(5197):483-489.

Collins KL, 1998. *HIV-1 Nef protein protects primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes.* Nature 391:397-401

Cooper DA, Gold J, Maclean P, 1985. *Acute AIDS retrovirus infection. Definition of clinical illness associated with seroconversion.* Lancet, 1: 537-40.

Christopherson C, Kidane Y, Conway B, Krowka J, Sheppard H, Kwok S, 2000. *PCR-Based assay to quantify human immunodeficiency virus type 1 DNA in peripheral blood mononuclear cells.* J Clin Microbiol, 38 (2): 630-634.

Cullen BR, 1998. *Posttranscriptional regulation by the HIV-1 Rev protein.* Sem Virol. 8:327-334.

Cui L et al, 1996. *Effect of beta-enantiomeric and racemic nucleoside analogues on mitochondrial functions in HepG2 cells: Implications for predicting drug hepatotoxicity.* Biochem Pharmacol. 52:1577-1584.

D'Ettorre G, Zaffiri L, Ceccarelli G, Mastroianni CM, Vullo V: *The role of HIV-DNA testing in clinical practice.* New Microbiologica 2010; 33: 1-11.

Dahl V, Joseffson L, Palmer S, 2010. *HIV reservoir, latency and reactivation: prospects for eradication.* Antiviral research, 85: 286-294.

Davey RT, Bhat N, Yoder C, Chun T, Metcalf TW, Dewar R, Natarajan V, Lempicki RA, Adelsberger JW, Miller KD, Fauci AS, Lane HC, 1999. *HIV-1 and T cells dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression.* Proc Natl Acad Sci, 96: 15109-15114.

- Davies JF, Hostomska Z, Hostomsky Z, Jordan SR, Matthews DA, 1991. *Crystal structure of the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase. Science* 252:88-95.
- De Marco A, Muller B, Glass B, Riches JD, Krausslich HG, Briggs JA, 2010. *Structural analysis of HIV-1 maturation using cryo-electron tomography. PloS Pathog*, 6 (11).
- Deeks SG et al, 1997. *HIV-1 protease inhibitors: A review for clinicians. JAMA.* 277:145-153.
- Deng H, Liu R, Ellemeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhardt M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton SE, Hill MC, Davis CB, Peiperi SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR, 1996. *Identification of a major coreceptor for primary isolates of HIV-1. Nature* 381:661-666.
- De Rossi A, Walker AS, De Forni D, Gibb DM; Pediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA), 2002. *Biphasic decay of cell-associated HIV-1 DNA in HIV-1-infected children on antiretroviral therapy. AIDS*,16 (14): 1961-1963.
- Desirè N, Dehèe A, Schneider V, Jacomet C, Goujon C, Girard PM, Rozenbaum W, Nicolas JC, 2001. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan Real-Time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 39 (4): 1303-1310.
- Danzani F, Antonelli G, Rive E, Uccini S, Visco G, 1996. *Plasma HIV viremia and viral load in lymph nodes. Nature Med*, 2: 832-833.
- Domingo E et al, 1999. *Viral quasispecies and fitness variations.* In Domingo E, Webster R, Holland J, editors. *Origin and evolution of viruses.* San Diego: Academic Press 141-161
- Donegan E, Stuart M, Niland JC, Sacks HS, Azen SP, Dietrich SL, Faucett C, Fletcher MA, Kleinman SH, 1990. *Infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV1) among recipients of antibody-positive blood donations. Ann Intern Med.* 113:733-739.
- Doyle T, Geretti AM, 2012. *Low-level viremia on HAART: significance and management. Curr Opin Infect Dis*, 25 : 17-25.
- Dyer JR, Eron JJ, Hoffman IF, Kazembe P, Vernazza PL, Nkata E, Daly CC, Fiscus SA, Cohen MS,1998. *Association of CD4 cell depletion and elevated blood and seminal plasma human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA concentrations with genital ulcer disease in HIV-1-infected men in Malawi. J Infect Dis.* 1998;177:224-227.
- Dube MP et al, 1997. *Protease inhibitor-associated Hyperglycaemia. Lancet.* 350:713-714.
- Dube MP, 2000. *Disorders of glucose metabolism in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis.* 31:1467-1475.
- Eastone JA, Dekker CF, 1997. *New-onset diabetes mellitus associated with use of protease inhibitor. Ann Intern Med.* 127:948.
- Ehrnst A et al. *HIV in pregnant women and their offspring: Evidence for late transmission. Lancet.* 1991;338:203-207.

Erice A, Rhamé FS, Heussner RC, Dunn DL, Balfour HH, 1991. *Human immunodeficiency virus infection in patients with solid-organ transplantation: Report of five cases and review.* *Rev Infect Dis.* 13:537-547.

European AIDS Clinical Society. European Guidelines for treatment of HIV infected adults in Europe. Version 6, (2011). [http://www.europeanaidscinicalsociety.org/images/stories/EACS-Pdf/eacsguidelines-v6\\_english.pdf](http://www.europeanaidscinicalsociety.org/images/stories/EACS-Pdf/eacsguidelines-v6_english.pdf). [Accessed 6 December 2011]

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA, 1996. *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein coupled receptor.* *Science*, 272:872-877.

Finzi D, Hermanokva M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson C, Quinn RE, Chadwick K, Margolik J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF, 1997. *Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy.* *Science*, 278: 1295-1300.

Flexner C, 1998. *HIV-protease inhibitors.* *N Engl J Med.* 338:1281-1292.

Freed EO, 2001. HIV replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 26 (1-6), 13-33.

Furman PA et al, 1986. *Phosphorylation of 3'azido-2',3'-dideoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase.* *Proc Natl Acad Sci USA.*83:8333-8337.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, 1984. *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS.* *Science* 224 (4648): 500–3.

Gao F, Robertson DL, Carruthers CD, Morrison SG, Jian B, Chen Y, Barrè-Sinoussi F, Girard M, Srinivasan A, Abimiku AG, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH, 1998. *A comprehensive panel of near-full length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1.* *J Virol.* 1998;72:5680-5698.

Gianotti N, Galli L, Racca S, Sampietro S, Cossarini F, Spagnolo V, Barda B, Canducci F, Clementi M, Lazzarin A, Castagna A, 2012. *Residual viraemia does not influence 1 year virological rebound in HIV-infected patients with HIV RNA persistently below 50 copies/mL.* *J Antimicrob Chemother*, 67: 213-217.

Goujard C, Bonarek M, Meyer L, Bonnet F, Chaix ML, Deveau C, Sinet M, Galimand J, Delfraissy JF, Venet A, Rouizoux C, Morlat P, 2006. *CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients.* *Clinical Infectious Disease*, 42: 709-15.

Greene WC, Hepsetein FH, 1991. *The molecular biology of human immunodeficiency virus type I infection.* *N Engl J Med* 324:308-317.

Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, Nayak L, Moss PA, 2005. *The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age.* *Clinical and experimental immunology*, 140 (3): 540-546.

Haim-Boukobza S, et al. 2011. *Higher efficacy of nevirapine than efavirenz to achieve HIV-1 plasma viral load below 1 copy/ml.* AIDS 25: 341–344.

Harrison, Kasper, Braunwald, Fauci, Hase, Longo, Jameson, 2005. *Pincipi di medicina interna*, 16° edizione, eds McGraw-Hill, p 1234.

He J, Choe S, Walker R, Di Marzio P, Morgan DO, Landau NR, 1995. *Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity.* J Virol 69 (11): 6705-6711.

Henrad DR et al. *Detection of human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen and plasma RNA: Relevance to indeterminate serologic tests.* Transfusion. 1994;34:376-380.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R, 1992. *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.* Biotechnology 10: 413-417.

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M, 1995. *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.* Nature 12;373(6510):123-126.

Hosseinpour M et al, 2002. *Can antiretroviral therapy be used to prevent sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1?* Clin Infect Dis. 34:1391-1395

Hostomsky Z, Hostomska Z, Hudson GO, Moomaw EW, Nodes BR, 1991. *Reconstitution in vitro of Rnase H activity by using purified N-terminal and C-terminal domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase.* Proc Nat Acad Sci USA, 88:1148-1152.

Huang W, Eshleman SH, Toma J, 2007. *Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations.* J Virol 2007; 81: 7885–7893.

Ibanez A, Puig T, Elias J, Clotet B, Ruiz L, Martinez MA, 1999. *Quantification of total and integrated HIV-1 DNA after long-term highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients.* AIDS, 13: 1045-1049.

Jamieson DJ et al, 2003. *HIV viral load and other risk factors for mother-to-child transmission of HIV-1 in a breast-feeding population in Cote d'Ivoire.* J Acquir Immune Defic Syndr 1;34:431-436.

Jones WK, and Curran JW. *Epidemiology of HIV infection in industrialized countries.* In: Broder S, Merigan TC, Bolognesi D., eds . textbook of AIDS medicine. Baltimore: Williams and Wilkins 1994, 91-108.

Kaplank AH, Manchester M, Swanstrom R. *The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency.* J Virol. 68(10):6782-6, 1994.

- Koelsch KK, Liu L, Haubrich R, May S, Havlir D, Günthard HF, Ignacio CC, Campos-Soto P, Little SJ, Shafer R, Robbins GK, D'Aquila RT, Kawano Y, Young K, Dao P, Spina CA, Richman DD, Wong JK, 2008. *Dynamics of total, linear nonintegrated, and integrated HIV-1 DNA in vivo and in vitro*. The Journal of infectious diseases, 197 (3): 411-419.
- Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA, 1992. *Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor*. Science 256(5065):1783-90.
- Kulkosky J, Bray S, 2006. *HAART-persistent HIV-1 latent reservoirs: their origin, their mechanisms of stability and potential strategies for eradication*. Curr HIV Res, 4:199-208.
- La Placa M, 2006: I Retrovirus Umani. In: Principi di Microbiologia Medica, 10ª edizione, La Placa M ed Società Editrice Esculapio Publ, Bologna, pp 665-681.
- Langford D, Marquie-Beck J, De Almeida S, Lazzaretto D, Letendre S, Grant I, McCutchan JA, Masliah E, Ellis RJ, 2006. *Relationship of antiretroviral treatment to postmortem brain tissue viral load in human immunodeficiency virus-infected patients*. J Neuro Virol, 12: 100-108.
- Letvin NL. Animal models for AIDS. *Immunol Today*. 1990;11(9):322-326.
- Lewer A. *Regulatory protein of HIV*. Medical Virology 1: 155-163, 1991.
- Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, Reilly C, Carlis J, Miller CJ, Haase AT, 2005. *Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells*. Nature, 434 (7037): 1148-1152.
- Lo JC, Mulligan K, Tai VW, Algren H, Schambellan M, 1998. *"Buffalo hump" in men with HIV-1 infection*. Lancet. 351:867-870.
- Lonergan JT, Behling C, Pfander H et al, 2000. *Hiperlactatemia and hepatic abnormalities in 10 human immunodeficiency virus-infected patients receiving nucleoside analogue combination regimens*. Clin Infect Dis. 31:162-166.
- MacLeod MK, Kappler JW, Marrack P, 2010. Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment. Immunology, 130 (1): 10-15.
- Maggiolo F, Airoidi M, Callegaro A, Martinelli C, Dolara A, Bini T, Gregis G, Quinzan G, Suter F, 2004. *Effect of prolonged discontinuation of successful antiretroviral therapy on CD T cells: a controlled prospective trials*. AIDS, 18: 439-446.
- Mansky LM, 1998. *Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation*. J Gen Virol 79 (6):1337-1345.
- Markowitz M, Jin X, Hurley A, Simon V, Ramratnam B, Louie M, Deschenes GR, Ramanathan M, Barsoum S, Vanderhoeven J, He T, Chung C, Murray J, Perelson AS, Zhang L, Ho DD, 2002. *Discontinuation of antiretroviral therapy commenced early during the course of human immunodeficiency virus type 1 infection, with or without adjunctive vaccination*. J infect Dis, 186: 634-643.



- Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strebel K, Benarous R, 1998. *A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif.* *Mol Cell* 1(4):565-574.
- Masquelier B, Taieb A, Reigadas S, Marchou B, Cheneau C, Spire B, Charpentier C, Leport C, Raffi F, Chêne G, Descamps D; APROCO-COPILOTE study group, 2011. *Cellular HIV-1 quantification and short-term and long-term response to antiretroviral therapy.* *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66 (7): 1582-1589.
- Masuda T, Planelles V, Krogstad P, Chen ISY, 1995. *Genetic analyses of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the U3 att site: unusual phenotype of mutants in the zinc finger-like domain.* *J Virol.* 1995;69:6687-6696.
- McCusker J, Koblin B, Lewis BF, Sullivan J, 1990. *Demographic characteristics, risk behaviors and HIV seroprevalence among intravenous drug users by site of contact: Results from a communitywide HIV surveillance project.* *Am J Public Health.* 80:1062-1067.
- McDermott JL, Giri AA, Martini A, Bono M, Giacomini M, Campelli A, Tagliaferro L, Cara A, Varnier OE, 1999. *Level of human immunodeficiency virus DNA in peripheral blood mononuclear cells correlates with efficacy of antiretroviral therapy.* *J Clin Microbiol*, 37 (7): 2361-2365.
- McDonald CK, Kuritzkes DR, 1997. *Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors.* *Arch Intern Med.* 157:951-959.
- Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA, 1996. *Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma.* *Science*, 272 (5265): 1167-1170.
- Mellors JW, Margolik JB, Phair JP, Rinaldo CR, Detels R, Jacobson LP, Munoz A, 2007. *Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV infection.* *JAMA*, 297 (21): 2349-2350.
- Miller KD, Jones E, Yanovsky JA, Shankar R, Feuerstein I, Falloon J, 1998. *Visceral abdominal-fat accumulation associated with use of indinavir.* *Lancet.* 351:871-875.
- Mocroft A, Devereux H, Kinloch-de-Loes S, Wilson D, Madge S, Youle M, Tyrer M, Leveday C, Phillips AN, Johnson MA, 2000. *Immunological, virological and clinical response to highly active antiretroviral therapy treatment regimens in a complete clinic population.* *Royal Free Centre for HIV Medicine. AIDS*, 14 (11) 1545-1552.
- Mofenson LM, Lambert JS, Stiehm ER, Bethel J et al, 1999. *Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine.* *N Engl J Med.* 1999;341:385-393.
- Mokili J, Rogers M, Carr J, 2002. *Identification of a novel clade of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Democratic Republic of Congo.* *AIDS Res Hum Retroviruses* 18 (11):817-823.

- Monier P et al, 2000. *Osteonecrosis complicating highly active antiretroviral therapy in patients infected with human immunodeficiency virus*. Clin Infect Dis. 31:1488-1492.
- Moore JP, Doms RW, 2003. *The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine*. Proc Nat Ac Sci 100, 10598-10602.
- Moroni M, Lazzarin A, Uberti Foppa C, Balotta C, 2008. *Infezione da HIV e sindrome da immunodeficienza acquisita*. In: Malattie Infettive, 7° edizione, Elsevier Mass on Publ, Milano, 2008, pp 835-889.
- Muller V, Vigueras-Gomez JF, Bonhoeffer S, 2002. *Decelerating decay of latently infected cells during prolonged therapy for human immunodeficiency virus type 1 infection*. J. Virology 75: 4091-4102.
- Musicco M et al, 1994. *Antiretroviral treatment of men infected with human immunodeficiency virus type 1 reduces the incidence of eterosexual transmission: Italian Study Group on HIV Heterosexual Transmission*. Arch Intern Med. 154:1971-1976.
- Murphy G, Charlett A, Jordan LF, Osner N, Gill ON, Parry JV, 2004. *HIV incidence appear constant in men who have sex with men despite widespread use of effective antiretroviral therapy*. AIDS 18: 265-272.
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A., 2003. Microbiologia, 2° edizione, eds RdISES, pp 590-592.
- Myers G, and Pavlakis GN. Evolutionary potential of complex retroviruses. In: Levy J.A., ed. The retroviridae. New York: Plenum. Press 1992; 51-105.
- Ngo-Giang-Huong N, Deveau C, Da Silva I, Pellegrin I, Venet A, Harzic M, Sinet M, Delfraissy JF, Meyer L, Goujard C, Rouzioux C; French PRIMO Cohort Study Group: *Proviral HIV-1 DNA in subjects followed since primary HIV-1 infection who suppress plasma viral load after one year of highly active antiretroviral therapy*. AIDS 2001; 15(6): 665-673.
- Nicastri E, et al. 2008. *HIV-1 residual viremia and proviral DNA in patients with suppressed plasma viral load (400 HIV-RNA cp/ml) during different antiretroviral regimens*. Curr. HIV Res. 6:261–266.
- Noë A, Plum J, Verhofstede C, 2005. *The latent HIV reservoir in patients undergoing HAART : an archive of pre-HAART drug resistance*. J Antimicrob Chemother, 55: 410-412.
- Nuwayhid N.F, 1995. *Laboratory test for detection of human immunodeficiency virus type 1 infection*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2 (6): 637-645.
- Ostrowski MA, Chun TW, Justement SJ, 1999. *Both memory and CD45RA+/CD262L+ naive CD4+ T cells are infected in human immunodeficiency virus type 1- infected individuals*. J virol, 73: 6430-6435.
- Pace MJ, Agosto L, Graf EH, O'Doherty U, 2011. *HIV reservoirs and latency models*. Virology, 411: 344-354.

- Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DS, Holmberg SD, 1998. *Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection*. N Engl J Med, 338 (13): 853-860.
- Palmer S, Alaeus A, Albert J, Cox S, 1998. *Drug susceptibility of subtypes A, B, C, D and E human immunodeficiency virus type 1 primary isolates*. AIDS Res Hum Retroviruses. 1998;14:157-162.
- Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, Bernstein B, Hanna GJ, Brun SC, Kempf DJ, Mellors JW, Coffin MC, King MS, 2008. *Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci, 105, N°10: 3879-3884.
- Pantaleo G., Graziosi C., Demaresi J.F. *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease*. Nature 362: 355-359,1993.
- Pantaleo G., Graziosi C., Fauci A.S., 1993. *The immunopathogenesis of human deficiency virus infection*. N. Engl. J Med. 328: 327-335.
- Pantaleo G., Graziosi C., Fauci A.S. *New concept in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. N. Engl. J Med. 328 (5): 327-355, 1993.
- Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, Pizzo PA, Schnittman SM, Kotler DP, Fauci AS, 1991. *Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus*. Prot Natl Acad Sci 88 (21): 9838-9842.
- Paolucci S, Baldanti F, Campanini G, Zavattoni M, Cattaneo E, Dossena L, Gerna G, 2001. *Analysis of HIV drug-resistant quasiespecies in plasma, peripheral blood mononuclear cells and viral isolates from treatment-naïve and HAART patients*. J Med Virol, 65 (2): 207-217.
- Parisi SG, Andreis S, Mengoli C, Scaggiante R, Ferretto R, Manfrin V, Cruciali M, Giobbia M, Boldrin C, Basso M, Androni M, Palù G, Sarmati L, 2012. *Baseline Cellular HIV DNA Load Predicts HIV DNA Decline and Residual HIV Plasma Levels during Effective Antiretroviral Therapy*. J Clin Microbiol, 258-263.
- Pavlikis GN et al. *Structure, splicing and regulation of expression of HIV-1: a model for the general organisation of lentiviruses*. In Koff WC, Kennedy RC, Wong-Staal F editors. *AIDS Research Reviews*. Vol 2. Marcel Dekker, New York. 1992;41-63.
- Pierson T, Mc Arthur J, Siliciano RF, 2000. *Reservoirs for HIV : mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune response and antiretroviral therapy*. Annual Review of Immunology, 18; 665-708.
- Piketty C, Weiss L, Assoumou L, Burgard M, Mèlard A, Ragnaud JM, Bentata M, Girard PM, Rouizoux C, Costagliola D, 2010. *A high HIV DNA level in PBMCs at antiretroviral treatment interruption predicts shorter time to treatment resumption, independently of the CD4 nadir*. J Med Virol, 82: 1819-1828.
- Piot P, Plummer PA, 1999. *Genital ulcer adenopathy syndrome*. In Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, editors. *Sexually Transmitted Diseases*. 2nd ad. New York: McGraw-Hill 711-716.

- Piscitelli SC, Flexner C, Minor JR, Polis MA, Masur H, 1996. *Drug interactions in patients infected with human immunodeficiency virus*. Clin Infect Dis. 23:685-693.
- Piscitelli SC, Gallicano KD, 2001. *Interactions among drugs for HIV and opportunistic infections*. N Engl J Med. 344:984-996.
- Plummer FA, Simonsen NJ, Cameron WD, Kreiss JK, Gakinya MN, Waiyaki P, Cheang M, Piot P, Ronald AL, Ngugi EN, 1991. *Cofactors in male-female sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1*. J Infect Dis. 163:233-239.
- Pomerantz RJ, 2002. *Reservoirs of human immunodeficiency virus type 1: the main obstacles to viral eradication*. Clin Infect Dis. 34(1):91-7.
- Pomerantz RJ, 2003. *Reservoir, sanctuaries and residual disease: the hiding spots of HIV-1*. HIV Clin Trials, 4 (2): 137-143.
- Pongoski J, Asai K, Cochrane A, 2001. *Positive and negative modulation of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by cis and trans regulators of viral RNA splicing*. J Virol 76(10):5108-5120.
- Re MC, Vitone F, Sighinolfi L, Schiavone P, Ghinelli F, Gibellini D, 2005. *Different patterns of HIV-DNA after therapy discontinuation*. BMC infect Dis, 5: 69-75.
- Re MC, Vitone F, Bon I, Schiavone P, Gibellini D, 2006. *Meaning of DNA detection during the follow up of HIV-1 infected patients: a brief review*. New Microbiol 29 (2): 81-88.
- Rice P, Craigie R, Davies DR. *Retroviral integrases and their cousins*. Curr Opin Struct Biol. 6(1):76-83, 1996.
- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA et al. HIV-1 nomenclature proposal. In: Human retroviruses and AIDS 1999: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Kuiken CL, Foley B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx PA, eds. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.
- Rockstroh JK, Mauss S, 2004. *Clinical perspective of fusion inhibitors for treatment of HIV*. J Antimicrob Chemother. 53 (5):700-7002.
- Rong L, Perelson AS, 2009. *Modeling HIV persistence, the latent reservoir, and viral blips*. Journal of theoretical biology, 260 (2): 308-331.
- Rouizoux C, Hubert JB, Burgard M, Deveau C, Goujard C, Bary M, Sèrèni D, Viard JP, Delfaissy JF, Meyer L, 2005. *Early levels of HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells are predictive of disease progression independently of HIV-1 RNA levels and CD4+ T cells count*. J Infect Dis, 192: 46-55.
- Ryder RW et al. *Perinatal transmission of the human immunodeficiency virus type 1 to infants of seropositive women in Zaire*. N Engl J Med. 1989;320:1637-1642.

Sarmati L, Parisi SG, Nicastrì E, D'Ettoire G, Palmisano L, Andreotti M, Andreoni C, Giuliano M, Gatti F, Boldrin C, Palù G, Vullo V, Vella S, Andreoni M, 2005. *Association between cellular human immunodeficiency virus DNA level and immunological parameters in patients with undetectable plasma viremia level during highly active antiretroviral therapy.* J Clin Microbiol, 43 (12): 6183-6185.

Sarmati L, Parisi SG, Nicastrì E, d'Ettoire G, Andreoni C, Dorì L, Gatti F, Montano M, Buonomini AR, Boldrin C, Palù G, Vullo V, Andreoni M: *Cellular HIV-1 DNA quantitation in patients during simplification therapy with protease inhibitor-sparing regimens.* Journal of Medical Virology 2007; 79: 880-886.

Sattentau Q.J., Weiss R.A. *CD4: HIV receptor and physiological ligand.* Cell. 52: 631-633, 1988.

Schacker TW, Little S, Connick E, Gebhard-Mitchell K, Zhang Z, Krieger J, Pryor J, Havlir D, Wong JK, Richman D, Corey L, Haase AT, 2000. *Rapid accumulation of human immunodeficiency virus (HIV) in lymphatic tissue reservoir during acute and early HIV infection: implications for timing of antiretroviral therapy.* J Infect Dis, 181: 354-357.

Schubach J, Gallo RC, 2000. Human retroviruses. In Steven S, Richard LH e Stephen AY (ed.), *Clin Vir Man.* 37: 513-532.

Schwarcz ST, Kellogg T, McFarland W, Louie B, Kohn R, Busch M, Katz M, Bolan G, Klausner J, Weinstock H, 2001. *Differences in the temporal trend of HIV seroincidence and seroprevalence among sexually transmitted disease clinic patients, 1989-1998: application of the serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion.* Am J Epidemiol, 153: 925-934.

Sherman MP, Greene WC, 2002. *Slipping through the door: HIV entry into the nucleus.* Microbes Infect. 64(11):67-73.

Shiramizu B, Paul R, Williams A, Shikuma C, Watters M, Grove J, Valcour V, 2007. *HIV proviral DNA associated with decreased neuropsychological function.* J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 19 (2): 157-163.

Shiramizu B, Williams AE, Shikuma C, Valcour V, 2009. *Amount of HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells is proportional to severity of HIV-1 associated neurocognitive disorders.* J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 21 (1): 68-74.

Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF, 2003. *Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells.* Nature medicine, 9 (6): 727-728.

Smith K, Aga E, Bosch RJ, Valdez H, Connick E, Landay A, Kuritzkes D, Gross BH, Francis IR, McCune JM, Kessler H, Lederman M, 2004. *Long-term changes in circulating CD4 T lymphocytes in virologically suppressed patients after 6 years of highly active antiretroviral therapy.* AIDS, 18 (14): 1953-1956

Stamm WE, Handsfield HH, Rompalo AM, Ashley RL, Roberts PL, Corey L, 1988. *The association between genital ulcer disease and acquisition of HIV infection in Homosexual men.* JAMA. 1988 260:1429-1433.

St.Clair MH et al, 1987. *3'-Azido-2',3'-deoxythymidine triphosphate as an inhibitor and substrate of purified human immunodeficiency virus reverse transcriptase*. *Antimicrob Agents Chemother*. 31:1972-1977.

Strain MC, Little SJ, Daar ES, 2005. *Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoir of HIV-1*. *J Infect Dis*, 191: 1410-18.

Suligoï B, Massi M, Galli C, Sciandra M, Di Sora F, Pezzotti P, Recchia O, Montella F, Sinicco F, Rezza G, 2002. *Identifying recent HIV infections using the Avidità Index and Automated Enzyme Immunoassay*. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 32: 424-428.

Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SH, 2008. *The challenge of HIV-1 subtype diversity*. *N Engl J Med* 2008;358:1590-602.

Tebas P, Henry WK, Matining R, Weng-Cherng D, Schmitz J, Valdez H, Jahed N, Myers L, Powderly WG, Katzenstein D, 2002. *Effect of prolonged discontinuation of successful antiretroviral therapy on CD4+ T cells decline in human immunodeficiency virus-infected patients: implications for intermittent therapeutic strategies*. *J Infect Dis*, 186: 851-854.

Thomas HI, Wilson S, O'Toole CM, Lister CM, Saeed AM, Watkins RP, Morgan-Capner P, 1996. *Differential maturation of avidity IgG antibodies to gp41, p24 and p17 following infection with HIV-1*. *Clin Exp Immunol*, 103: 185-191.

Thompson MA, Aberg JA, Cahn P, 2010. *Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel*. *J Am Med Assoc*; 304:321–333.

Tierney C, Lathey JL, Christopherson C, Bettendorf DM, D'Aquila RT, Hammer SM, Katzenstein DA, 2003. *Prognostic value of baseline human immunodeficiency virus DANN measurement for disease progression in patients receiving nucleoside therapy*. *J Infect Dis*, 187: 144-148.

Vandekerckhove L, Verhofstede C, Vogelaers D, 2008. *Maraviroc: integration of a new antiretroviral drug into clinical practice*. *J antimicrob Chemother*, 61: 1187-1190.

Varmus HE, Brown P, 1989. Mobile DNA. In Berg D, Howe MM, editors. *Retrovirus*. American Society for Microbiology Washington D.C.; 53-108.

Verhofstede C, Reniers S, Van Wanseele F, Plum J, 1994. *Evaluation of proviral copy number and plasma RNA level as early indicators of progression in HIV-1infection: correlation with virological and immunological markers of disease*. *AIDS* 8 (10): 1421-1427.

Viraben R, Aquilina C, 1998. *Indinavir-associated lipodystrophy*. *AIDS*. 12:F37-F39.

Ward JW, Deppe DA, Samson S, Perkins H, Holland P, Fernando L, Feorino PM, Thompson P, Kleinman S, Allen JR, 1987. *Risk of human immunodeficiency virus infection from blood donors who later developed the acquired immunodeficiency syndrome*. *Ann Intern Med*. 106:61-62.

Watanabe D, Ibe S, Uehira T, Minami R, Sasakawa A, Yajima K, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Taniguchi T, Kasai D, Nishida Y, Yamamoto M, Kaneda T, Shirasaka T, 2011. *Cellular HIV-1 DNA levels in patients receiving antiretroviral therapy strongly correlate with therapy initiation timing but not with therapy duration.* BMC Infectious Diseases 11: 146.

Wawer MJ et al, 2003. *Transmission per Coital Act, by Stage of HIV Infection in the HIV+ Index Partner, in Discordant Couples, Rakai, Uganda.* Abstract 40. In *Program and Abstracts 10th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections*, Boston, Mass.

Wei X, Ghosh SK, Taylo ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, 1995. *Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection.* Nature 12;373(6510):117-122.

Wood E, Hogg RS, Montaner JSG, 2005. *When to initiate antiretroviral therapy in HIV-1 infected adults: a review for clinicians and patients.* Lancet Infect Dis, 5: 407-14.

Wottawa A, Klein G, Altman H, 1974. *A method for the isolation of human and animal lymphocytes with Ficoll-Urografi.* Weiner Klin Wochenschr, 86: 161-163.

Wu Y, Marsh JW, 2001. *Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA.* Science, 293: 1503-6.

Yarchoan R et al. *Clinical pharmacology of 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine (zidovudine) and related dideoxynucleosides.* N Engl J Med. 1989;321:726-738.

Yerly S, Günthard HF, Fagard C, Joos B, Perneger TV, Hirschel B, Perrin L; Swiss HIV Cohort Study: *Proviral HIV-DNA predicts viral rebound and viral setpoint after structured treatment interruptions.* AIDS 2004; 18(14): 1951-1953.

Yilmaz G, 2001. *Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy.* J. Clin. Virol. 21: 187-196.

Young CL, Hu DJ, Byers R, Vanichseni N, Young NL, Nelson R, Mock PA, Choopanaya K, Janssen R, Mastro TD, Mei JV, 2003. *Evaluation of a sensitive/less sensitive testing algorithm using the bioMerieux Vironostika-LS assay for detecting recent HIV-1 subtype B or E infection in Thailand.* AIDS Res Hum Retrovir, 19: 481-486.

Zanchetta M, Walker S, Burighel N, Bellanova D, Rampon O, Giaquinto C, De Rossi A, 2006. *Long-term decay of the HIV-1 reservoir in HIV-1-infected children treated with highly active antiretroviral therapy.* J Infect Dis, 193: 1718-1723.

Zhang ZQ, Wietgreffe SW, Li Q, Shore MD, Duan L, Reilly C, Lifson JD, Haase AT, 2004. *Role of substrate availability and infection of resting and activated CD4+ T cells in transmission and acute simian immunodeficiency virus infection.* Proc Natl Acad Sci, 101 (15): 5640-5645.

Zhou W, Parent LJ, Willis JW, Resh MD, 1994. *Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids.* J Virol 68(4):2556-2569.

Zhou Q, Sharp PA, 1995. *Novel mechanism and factor for regulation by HIV-1 Tat. EMBO J.* 1995;16;14(2):321-328.



## Ringraziamenti

Ringrazio sentitamente la d.ssa Samantha Andreis che ha lavorato giorno e notte per la raccolta dei dati che sono presentati in questa tesi e alla quale devo molto, umanamente e professionalmente. Un vivissimo ringraziamento al prof. Saverio Parisi, che mi ha accolto nel suo gruppo e senza il quale non avrei mai raggiunto questo traguardo importante.

Il mio sentito riconoscimento va a tutti coloro che lavorano presso il servizio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova, in particolare a tutto il settore della biologia molecolare. Grazie a tutti, davvero.

Il mio grazie più sincero a Eleonora, che merita quanto me il dottorato per la pazienza e l'amore con la quale mi è stata accanto in questi tre anni e alla quale dedico questo lavoro di tesi. Ai miei genitori Massimo e Lorenza, che hanno creduto in me più di quanto non abbia fatto io stesso.

A whole-hearted thanks to my very friends Jit and An from Calcutta, for sharing joy in the happy moments and for encouraging me in the difficult periods of my PhD. Thanks a lot.