

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE BIOMEDICHE

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: **06/A3** Microbiologia e microbiologia clinica

Settore Scientifico disciplinare: **MED/07** Microbiologia e microbiologia clinica

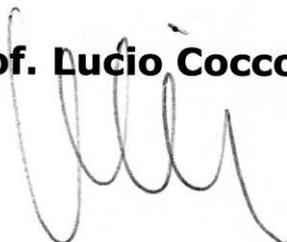
**ANALISI DEI MECCANISMI PATOGENETICI ALLA
BASE DEL DANNO VASCOLARE HIV-INDOTTO**

Presentata da: **Dott.ssa Anna Miserocchi**

Coordinatore Dottorato:

Relatore:

Prof. Lucio Cocco



Prof.ssa Maria Carla Re



INDICE

1. INTRODUZIONE	3
2. IL VIRUS HIV	5
2.1 Classificazione	5
2.2 Struttura del virione	6
2.3 Genoma virale	8
2.4 Proteoma virale	9
2.4.1 Proteine strutturali	9
2.4.2 Proteine regolatrici e accessorie	10
2.5 Eterogeneità molecolare di HIV	12
2.6 Ciclo replicativo di HIV	14
2.6.1 Entrata del virus nella cellula ospite	14
2.6.2 Retrotrascrizione e integrazione	15
2.6.3 Trascrizione	17
2.6.4 Assemblaggio e liberazione delle particelle virali mature	19
2.7 Patogenesi di HIV	20
2.7.1 Eventi precoci per l'instaurarsi dell'infezione primaria	20
2.7.2 Attivazione immunitaria e immunodeficienza	21
2.7.3 Evasione del controllo immunitario	24
2.8 Long-term non-progressors e Long-term survivors	25
2.9 Patologie sistemiche	26
2.9.1 Nefropatie	27
2.9.2 Danno epatico	27
2.9.3 Osteopenia e osteoporosi	29
2.9.4 Patologie del sistema nervoso centrale	31
2.9.5 Patologie cardiovascolari	32
2.10 Terapia antiretrovirale	34
3. LA STRUTTURA VASCOLARE E L'ENDOTELIO	37
3.1 Progenitori endoteliali da pareti vascolari	40
3.2 La nicchia di residenza delle VW-EPC	42
3.3 Cellule staminali mesenchimali residenti nelle pareti vascolari	44
4. OBIETTIVO DELLA TESI	47
5. MATERIALI E METODI	49
5.1 Isolamento e differenziamento delle MSC	49
5.2 Stock virali e protocolli di infezione	51
5.3 Trattamento delle colture cellulari con Tat	52
5.4 Saggio di integrazione e rilevamento del DNA provirale	52
5.5 Saggi di amplificazione con RT-PCR	53
5.6 Saggi sull'apoptosi	55
5.7 Analisi dei marcatori di superficie e intracellulari	55
5.8 Saggio sull'espressione di PPARγ	56
5.9 Trattamento delle colture cellulari con farmaci antiretrovirali	56

5.10	Analisi statistiche.....	57
6.	RISULTATI	58
6.1	Isolamento di cellule staminali mesenchimali umane da pareti arteriose	58
6.2	HIV-1IIIIB e HIV-1Ada retrotrascrivono il proprio genoma e lo integrano nel DNA delle MSC	62
6.3	HIV-1 e gp120 ricombinante inducono apoptosi in colture di MSC non confluenti	64
6.4	La proteina Tat ricombinante induce apoptosi in colture di MSC non a confluenza	66
6.5	HIV e gp120 ricombinante inducono un incremento del differenziamento adipogenico delle MSC	68
6.6	La proteina Tat modula positivamente il differenziamento adipogenico delle MSC	73
6.7	HIV-1 e la proteina gp120 inibiscono il differenziamento endoteliale delle MSC	77
6.8	La proteina Tat inibisce il differenziamento endoteliale delle MSC	80
6.9	I farmaci inibitori della proteasi virale inibiscono il differenziamento endoteliale	83
7.	DISCUSSIONE	86
8.	BIBLIOGRAFIA	97

1. INTRODUZIONE

La Sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) è uno stato morboso che interessa principalmente il sistema immunitario. La perdita dell'integrità nel sistema immunitario determina la comparsa progressiva di infezioni opportunistiche e neoplasie che portano all'*exitus* del paziente.

L'agente etiologico dell'AIDS è il virus dell'immunodeficienza umana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*), che ha una trasmissione per via parenterale attraverso il contatto con sangue ed emoderivati infetti, per via sessuale e dalla madre infetta al figlio durante la gravidanza, al momento della nascita o successivamente con l'allattamento. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, *World Health Organization*) e il Programma delle Nazioni Unite per l'HIV/AIDS (UNAIDS) hanno stimato che alla fine del 2012 le persone (adulti e bambini) infette/affette da HIV/AIDS erano 35,3 milioni (32 milioni di adulti e 3,3 milioni di bambini), con 2,3 milioni di nuove infezioni e 1,6 milioni di decessi (**WHO, UNAIDS, 2013**).

Non esisteva un trattamento per questa infezione fino al 1996, quando fu introdotto un innovativo regime terapeutico altamente efficace (HAART, *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*), chiamato anche cART, (*Combined Anti-Retroviral Therapy*), che ha trasformato l'infezione di HIV da patologia con sviluppo letale a cronica, anche se a causa della presenza dei *reservoir* e della comparsa di resistenze farmacologiche, la cART non riesce a eradicare l'infezione stessa.

Il trattamento ha quindi ridotto il numero dei pazienti che sviluppavano l'AIDS e dei relativi decessi. Secondo le stime di UNAIDS, il numero di nuove infezioni verificatesi nel 2012 (2,3 milioni) è il minore dal 1990, quando era stimato a circa 3,5 milioni all'anno. Il numero di infezioni da HIV è diminuito del 50% in 26 paesi tra il 2001 e il 2012 ed è calato tra il 25% e il 49% in altri 17 paesi.

Il calo delle nuove infezioni è particolarmente consistente tra i bambini: dal 2001 al 2012 il numero dei bambini che hanno contratto l'HIV è calato del 52% (da 550000 a 260000).

Nonostante questi incoraggianti progressi e il continuo miglioramento dei servizi di accesso alla diagnosi e alla terapia, l'infezione da HIV rimane un problema centrale nell'ambito della sanità mondiale e della ricerca scientifica.

2. IL VIRUS HIV

2.1 Classificazione

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), responsabile della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), appartiene alla famiglia dei *Retroviridae*, genere *Lentivirinae*.

Il genoma dei retrovirus è formato da due molecole di RNA a polarità positiva, che vengono retrotrascritte da una DNA polimerasi RNA-dipendente (trascrittasi inversa) in molecole di DNA bicatenario (provirus) che si integrano nel genoma della cellula ospite **(La Placa, 2012)**. Questo peculiare ciclo di replicazione permette una ampia gamma di interazioni con le cellule ospiti e studi su Retrovirus animali hanno permesso di rilevare come sequenze retrovirali possano restare silenti all'interno del genoma della linea germinale in molte specie e come possano essere causa di infezioni rapidamente progressive e fatali, con l'induzione di tumori specifici.

L'abilità dei retrovirus di acquisire e alterare la struttura e le funzioni delle sequenze della cellula ospite ha infatti rivoluzionato lo studio della oncogenesi. I Retrovirus possono inserire le proprie sequenze all'interno del genoma nella linea germinale e funzionare come elementi trasponibili del genoma, attivando o inattivando geni che si trovano in prossimità dei siti di inserzione. La maggior parte delle patologie umane causate da virus sono la conseguenza dei danni tissutali dovuti al virus stesso o derivano dalla risposta cellulare al virus. I retrovirus in particolare possono indurre un diverso grado di immunodeficienza che rende l'ospite suscettibile a infezioni opportunistiche **(Kasper e Fauci, 2010)**.

La famiglia dei Retrovirus comprende due sottofamiglie, *Orthoretrovirinae* e *Spumaretrovirinae* e sette generi, classificati in base a similitudini nelle sequenze aminoacidiche a livello della trascrittasi inversa, di cui cinque sono stati correlati all'insorgenza di tumori nell'animale e almeno in un caso (*Deltaretrovirus*) nell'uomo.

La sottofamiglia degli *Orthoretrovirinae* comprende:

- *Alfaretrovirus*: tra i quali il virus del sarcoma di Rous e altri retrovirus in grado di causare tumori negli uccelli come il virus della leucemia aviaria e il virus del sarcoma aviario
- *Betaretrovirus*: causano tumori mammari nel topo
- *Gammaretrovirus*: causano sarcomi nel gatto
- *Deltaretrovirus*: comprendono il virus della leucemia bovina e i virus linfotropici dei primati, tra i quali il virus della leucemia della scimmia e il virus della leucemia umana a cellule T di tipo 1 e di tipo 2 (*Human T-cell Leukemia/Lymphoma Virus*, HTLV)
- *Epsilonretrovirus*: comprende il virus del sarcoma dermico di Walleye, di interesse esclusivamente veterinario
- *Lentivirus*: comprendono retrovirus che provocano manifestazioni patologiche in seguito ad un lungo periodo di incubazione. Infettano di preferenza le cellule linfoidi preposte alla risposta immunitaria. Di questa classe fanno parte l'HIV di tipo 1 e di tipo 2 e i virus che provocano immunodeficienza negli animali.

La sottofamiglia degli *Spumavirinae* comprende solo il genere *Spumavirus*, così denominato in quanto provoca nelle cellule infettate una fitta formazione di vacuoli che conferiscono alle cellule un aspetto "schiumoso".

Gli *Spumavirus* possono infettare diverse specie di vertebrati, fra cui l'uomo; tuttavia non sono stati collegati in maniera significativa ad alcun processo patologico (**La Placa, 2012**).

2.2 Struttura del virione

Al microscopio elettronico il virione appare come una struttura icosaedrica con un diametro di 100-120 nm, al cui interno è possibile distinguere il capsido di forma tronco-conica. La particella virale è costituita da un involucro esterno, detto *envelope* o pericapside e da

un *core* nucleoproteico rappresentato dal capsid e dal genoma di HIV. Il pericapsid è costituito da un doppio strato fosfolipidico al quale sono associate le proteine gp120 e gp41, mentre il capsid riveste la struttura genomica del virus ed è costituito principalmente dalle proteine p24 (proteina del capsid, CA), p9 e p7 (proteina nucleocapsidica, NC). All'interno del capsid si trovano il genoma a RNA positivo a singola catena e alcune proteine virali come la proteasi, l'integrasi e la trascrittasi inversa. Il virione neoformato gemma dalla membrana delle cellule infette, delle quali incorpora alcune proteine, incluse le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) di classe I e di classe II, che insieme al doppio strato fosfolipidico e alle proteine virali gp120 e gp41 costituiranno il pericapsid (**Kasper e Fauci, 2010**).

La proteina di transmembrana gp41 è inserita dentro l'involucro lipidico, mentre gp120 resta ancorata con la porzione COOH all'estremo amino-terminale di gp41 e viene esposta sulla superficie della particella virale. Le due proteine si associano tramite interazioni idrofobiche: in questo modo gp41 forma esameri che restano ancorati al doppio strato fosfolipidico e ai quali si lega un trimero di gp120. I dimeri costituiti da gp41 e gp120 formano i peplomeri.

La proteina p17 forma una matrice (MA) costituita da uno strato continuo di 7 nm tra il pericapsid e il nucleocapsid. Un'ancora di acido miristico la tiene legata alla membrana ed è fondamentale, insieme a una coda di residui aminoacidici basici, per l'assemblaggio della particella virale sulla superficie della cellula (**La Placa, 2012**).

Le proteine p24, p9 e p7 (NC) sono codificate dal gene gag e hanno il compito di costituire l'involucro capsidico. La proteina p24 matura forma il caratteristico *core* conico che avvolge il complesso RNA-proteine del virus (**Scarlata e Carter, 2003**). Inoltre, le proteine NC modulano in modo termodinamicamente favorevole la conformazione degli acidi nucleici, orchestrando il complesso

passaggio RNA-DNA coinvolto nella biologia del Retrovirus. Infatti, all'estremo amino-terminale tali proteine contengono numerosi residui basici che facilitano l'interazione con gli acidi nucleici. Le proteine NC sono coinvolte nell'assemblaggio del virus presentandosi sia in forma completamente processata, sia come precursore all'interno di gag p55. In quest'ultima forma riconoscono specificamente dimeri di RNA, posizionando il tRNA *primer* sul genoma per la replicazione virale (**Mirambeau et al., 2010**).

2.3 Genoma virale

Il genoma del virus dell'immunodeficienza umana è costituito da due molecole di RNA a polarità positiva poliadenilate all'estremo 3'. A un centinaio di basi dall'estremità 5' le due molecole di RNA sono appaiate a una corta molecola di RNA *transfer* di origine cellulare, che funge da *primer* per la trascrittasi inversa.

Alle estremità di ciascuna molecola di RNA genomico sono presenti due sequenze di basi delle quali quella più esterna (R) è ripetuta, mentre quella più interna è unica al 5' (U5) e al 3' (U3). Le due sequenze uniche sono retrotrascritte ad entrambe le estremità del DNA provirale, che risulta quindi più lungo della molecola di RNA di partenza. La sequenza U3-R-U5 di ogni estremità forma la *Long Terminal Repeat* (LTR), che costituisce la sequenza *promoter-enhancer* necessaria alla trascrizione del provirus.

Le due regioni LTR contengono quattro regioni funzionali alla trascrizione del virus: un elemento transattivante TAR (*Transactivation Response*), presente nella sequenza R e, localizzati sulla sequenza U3, un promotore principale, una sequenza *enhancer* e una regione modulatoria. Quest'ultima sembra contenere un elemento di regolazione negativa, in quanto delezioni in questa regione aumentano la trascrizione dipendente da LTR e la replicazione virale. Anche i siti di legame al promotore e i due motivi NF-kB

dell'*enhancer*, insieme a diverse proteine cellulari tra le quali AP-1, C/EBP, c-Myb e COUP che interagiscono con la regione modulatoria, sono implicati nella regolazione della trascrizione (**Pereira et al., 2000**). Il genoma di HIV viene assemblato grazie al riconoscimento, da parte del dominio nucleocapsidico (NC) della poliproteina Gag, di un segnale di *packaging* contenuto nella sequenza Ψ (psi), ovvero la regione che forma l'eterodimero di RNA al 5', costituita da quattro regioni *stem-loop* che interagiscono con i due motivi *zinc finger* di NC (**Amarasinghe et al., 2000**).

I tre geni fondamentali alla replicazione virale sono presenti in successione a partire dall'estremità 5' dell'RNA virale: *gag*, *pol*, *env*. Il gene *gag* (*group antigen*) codifica per le proteine del nucleocapside; il gene *pol* (*polymerase*) codifica per gli enzimi trascrittasi inversa, proteasi e integrasi; infine, il gene *env* (*envelope*) specifica le proteine del pericapside (**La Placa, 2012**). Il genoma di HIV contiene anche, ai lati del gene *env*, altri sei geni che codificano per proteine regolatrici e accessorie: *tat* (*Transactivation of Transcription*), *rev* (*Regulatory of Virus*), *vpu* (*Viral Protein U*), *nef* (*Negative Factor*), *vif* (*Viral Infectivity Factor*) e *vpr* (*Viral Protein R*), coinvolte a vario titolo nella regolazione e nella patogenesi di HIV (**La Placa, 2012; Kasper e Fauci, 2010**).

2.4 Proteoma virale

2.4.1 Proteine strutturali

I geni *gag*, *pol*, *env* sono tradotti in poliproteine in seguito scisse nelle proteine funzionali che vengono poi assemblate nella particella virale.

I geni *gag* e *pol* sono inizialmente cotradotti in un'unica poliproteina di 180 kDa (p180), poi divisa in una proteina da 55 kDa (p55, precursore delle proteine codificate da *gag*) e negli enzimi virus-

specifici (trascrittasi inversa, proteasi, integrasi). La proteina p55 viene scissa nella proteina p17 miristilata (MA) che lega il virione alla membrana cellulare, nella proteina p24 che forma il *core* virale e nella proteina nucleocapsidica p9 che si lega alle molecole di RNA.

Il gene *pol* codifica per proteasi, trascrittasi inversa e integrasi.

La trascrittasi inversa retrotrascrive l'RNA virale prima in una molecola di DNA monocatenario e successivamente a doppio filamento (provirus), che viene inserito nel genoma della cellula ospite attraverso l'azione dell'enzima integrasi. La proteasi serve a scindere la poliproteina Gag-Pol nelle proteine funzionali (**Kasper e Fauci, 2010**). Il gene *env* viene tradotto prima in una proteina di 88 kDa (p88) che viene poi glicosilata (gp160) e scissa nelle due glicoproteine gp41 e gp120.

2.4.2 Proteine regolatrici e accessorie

Tat (*Transactivation of Transcription*) è una proteina di 14 kDa che entra nel nucleo cellulare per attivare la trascrizione del provirus, legandosi alla sequenza *Tar* (*Tat-Responsive*) degli RNA messaggeri nascenti: facilita il reclutamento dei fattori di trascrizione sul promotore e lega proteine che fungono da adattatori trascrizionali (p300 e *CREB binding protein*) in quanto possiedono attività acetiltransferasica. Inoltre, Tat può legare il complesso ciclina T1/cdk9 che, fosforilando il dominio carbossiterminale dell'RNA polimerasi II cellulare, permette la completa trascrizione virale. Tat viene inoltre secreta all'esterno della cellula dove può interagire con la stessa cellula in cui è stata sintetizzata o con cellule vicine mediante un meccanismo autocrino/paracrino.

La proteina Rev (*Regulatory of Virus Expression*) è una proteina di 19 kDa che interagisce con specifiche sequenze *RRE* (*Rev-Responsive Elements*) sugli mRNA virali, proteggendoli dallo *splicing*, in modo che non vengano processati e possano essere esportati nel citoplasma

come messaggeri più lunghi **(La Placa, 2012)**.

La proteina Vpu (*Viral Protein U*) è una proteina dimerica integrale di membrana che induce il *turnover* dei CD4 reclutando un complesso ubiquitina-ligasi sul segmento citoplasmatico dei CD4, i quali vengono così poliubiquitinati e inviati al proteasoma per la degradazione. Questo meccanismo serve a facilitare il trasporto del prodotto del gene env verso la membrana cellulare, in quanto gp160 viene spesso trattenuta nel reticolo endoplasmatico dai CD4 neoprodotti: Vpu interagisce con i CD4 liberando così gp160 **(Amarasinghe, 2000)**. Vpu non fa parte del proteoma di HIV-2, dove è invece presente Vpx, la cui esatta funzione non è ancora stata stabilita **(La Placa, 2012)**.

La proteina Nef (*Negative Factor*) è una proteina miristilata associata al lato citoplasmatico della membrana cellulare. È una delle prime proteine ad essere espresse in seguito all'infezione virale e riveste un importante ruolo nella regolazione di proteine cellulari di superficie dei linfociti T *helper* e dei macrofagi. Infatti, Nef interagisce con la regione citoplasmatica dei CD4 e attraverso l'interazione con il complesso AP2 (*Clathrin Adaptor Protein Complex 2*), promuove il trasporto delle molecole di CD4 agli endosomi e ai lisosomi per la degradazione. Nef inoltre regola negativamente le molecole MHC di classe I, in particolare HLA-A e HLA-B attraverso due possibili meccanismi: potrebbe legarsi al segmento citoplasmatico di HLA-A/B e, grazie al reclutamento del complesso AP2, inviarli agli endosomi; oppure, Nef potrebbe assemblare un complesso di chinasi della famiglia di Src che induce l'endocitosi delle molecole di MHC di classe I dalla superficie cellulare.

La soppressione dell'espressione delle molecole MHC fornisce al virus un vantaggio selettivo, riducendo il riconoscimento delle cellule infette da parte dei linfociti T citotossici. Il terzo bersaglio della regolazione di Nef è rappresentato dal recettore delle cellule T che fa da ponte tra le cellule presentanti l'antigene (*Antigen Presenting Cells, APC*) e i linfociti T.

La proteina Vif (*Viral Infectivity Factor*) è una proteina di 23 kDa necessaria alla replicazione virale in alcuni tipi cellulari, definiti non permissivi. Esperimenti di fusione cellulare indicano che le cellule in grado di garantire la persistenza di virus sprovvisti della proteina Vif, non esprimono evidentemente fattori inibitori che bloccherebbero la replicazione virale in assenza di Vif (**Amarasinghe, 2000**).

La proteina Vpr (*Viral Protein R*) è una proteina di 14 kDa che favorisce il trasporto al nucleo del complesso nucleoproteico, in quanto contiene un segnale di localizzazione nucleare (**Nie et al., 1998**).

2.5 Eterogeneità molecolare di HIV

Analisi molecolari sulla sequenza di HIV hanno permesso di individuare due virus responsabili dell'AIDS: HIV-1 e HIV-2.

HIV-1 è diffuso in tutto il mondo ed è responsabile della maggior parte delle infezioni. HIV-2 è presente soprattutto nell'Africa occidentale, nei Caraibi e nell'America latina; è meno virulento e provoca una malattia con decorso più attenuato (**La Placa, 2012**).

Analisi molecolari di diversi isolati di HIV-1 rivelano un alto grado di variabilità delle sequenze in diverse regioni del genoma virale. Questa caratteristica dovuta alla alta infedeltà dell'azione della retrotrascrittasi, permette un'elevata percentuale di mutazioni con la comparsa di quasi-specie negli individui colpiti. L'equilibrio tra la pressione selettiva operata dal sistema immunitario e i vincoli funzionali sulle proteine influenzano il livello regionale di variabilità delle sequenze. Ad esempio l'*envelope*, essendo presente sulla superficie del virione e quindi esposto all'azione degli anticorpi e dei linfociti T, è molto variabile e presenta *clusters* di mutazioni organizzati in domini ipervariabili. Al contrario, la trascrittasi inversa, che possiede importanti funzioni enzimatiche ed è fondamentale alla replicazione virale, è relativamente conservata, in modo particolare

nelle vicinanze del sito attivo (**Kasper e Fauci, 2010**).

Mentre le sequenze dei geni env e nef sono le più soggette a variazioni, quelle di gag e pol sono le più conservate. La variabilità nelle sequenze di gag e pol è imputabile in genere a mutazioni puntiformi dovute soprattutto alla bassa fedeltà della trascrittasi inversa; mentre in env le variazioni comprendono più coppie di basi e sono dovute a delezioni, inserzioni e duplicazioni (**La Placa, 2012; Kasper e Fauci, 2010**). Oltre alla variabilità tra stipiti virali isolati da individui distinti, è stata riscontrata differenza di sequenze in ceppi virali isolati dal medesimo individuo in momenti diversi dell'infezione. La variabilità genomica di HIV-1 è rilevante per diversi aspetti della biologia del virus: dal tropismo di cellula o tessuto, al tipo di sintomatologia indotta, al diverso grado della risposta immune dell'ospite e condiziona evidentemente la possibilità di elaborare terapie o vaccini (**La Placa, 2012**).

HIV-1 si distingue in tre gruppi:

- M (*major*): comprende quasi tutti i virus responsabili della maggior parte delle infezioni da HIV nel mondo ed è ulteriormente classificato in almeno 11 sottotipi (denominati *clades*, da A a K), molti dei quali sono associati a determinate aree geografiche (la maggioranza dei paesi europei e gli Stati Uniti sono interessati dal sottotipo B). Questo gruppo comprende inoltre un numero crescente di forme ricombinanti circolanti (*Circulant Recombinant Forms, CRF*), di norma generate dall'infezione di due sottotipi di virus che ricombinano per produrre un nuovo virus con un vantaggio selettivo.
- O (*outlier*): una forma virale relativamente rara riscontrata in Camerun, Gabon e Francia.
- N (*non-M, non-O*): è molto raro ed è stato identificato per la prima volta in una donna del Camerun affetta da AIDS (**La**

Placa, 2012; Kasper e Fauci, 2010; Flint et al., 2000).

I virus di tipo M risultano probabilmente da un singolo evento di trasmissione scimmia-uomo, seguito dall'evoluzione divergente che ha portato alla nascita dei vari sottotipi, mentre i virus di tipo N ed O sembrano derivare da ulteriori eventi indipendenti di trasmissione scimmia-uomo. HIV-2 è distinguibile in almeno 6 sottotipi (da A ad F), anch'essi derivati da episodi indipendenti di trasmissione scimmia-uomo **(La Placa, 2012).**

2.6 Ciclo replicativo di HIV

In sintesi, il ciclo replicativo di HIV è costituito da una prima fase che comprende la penetrazione del virus all'interno della cellula, la retrotrascrizione del genoma virale e la produzione dei messaggeri e da una fase tardiva durante la quale vengono assemblati i nuovi virioni infettanti.

2.6.1 Entrata del virus nella cellula ospite

L'entrata di HIV nella cellula inizia con il legame della proteina virale gp120 dell'envelope di HIV a un recettore di superficie localizzato sulla membrana citoplasmatica della cellula ospite. Il principale recettore cellulare coinvolto nell'infezione è il CD4, presente sulla membrana delle cellule T, dei macrofagi, delle cellule dendritiche e della microglia; tuttavia interazioni di altro tipo tra le cellule CD4⁺ e la proteina gp120 sono richieste per l'entrata del virus in diversi tipi cellulari **(Permanyer et al., 2010)**. Il riconoscimento di CD4 da parte di gp120 rappresenta un passo fondamentale ma non sufficiente per l'entrata nelle cellule bersaglio in quanto è necessaria la presenza di corecettori. I corecettori che rivestono il ruolo di maggiore rilievo nell'interazione col virus fanno parte della famiglia dei recettori per chemochine a sette domini transmembrana: CXCR4

e CCR5. L'espressione dei diversi corecettori, in combinazione con la variabilità di gp120, determina il tropismo del virus.

La molecola CXCR4 è espressa in particolare sulla superficie della linea linfocitaria e i ceppi virali X4 che la utilizzano come corecettore principale per l'entrata nella cellula sono definiti linfotropi; mentre i ceppi R5, che riconoscono preferenzialmente il corecettore CCR5 espresso in quantità sui macrofagi, sono definiti monotropi (**Ugolini et al., 1999**). I ceppi che infettano entrambi gli stipiti cellulari con paragonabile efficienza sono invece classificati come HIV *dual-tropic*.

Il legame del virus al CD4 e a uno dei corecettori provoca modifiche conformazionali a gp120: gp41 viene in questo modo indotta a formare una struttura a sei eliche che si orienta parallelamente alla membrana cellulare e a quella virale, iniziando una serie di eventi che porteranno alla fusione tra le membrane (**Permanyer et al., 2010**).

2.6.2 Retrotrascrizione e integrazione

Una volta entrato nella cellula, HIV intraprende un processo denominato *uncoating* durante il quale si libera della struttura esterna e forma un complesso di retrotrascrizione in cui il genoma virale si combina con il tRNA *primer*, con l'integrasi, la retrotrascrittasi, la proteina della matrice, la proteina del nucleocapside, Vpr e con alcune proteine cellulari.

La retrotrascrizione ha inizio con il legame della molecola di tRNA al suo sito di legame sull'RNA virale: la retrotrascrittasi copia la molecola di RNA, generando un ibrido DNA/RNA compreso tra il sito di legame del *primer* e l'estremità 5' del filamento. La sequenza relativa all'RNA viene degradata dall'attività RNasica intrinseca nella trascrittasi inversa. Utilizzando le regioni R di omologia l'enzima promuove il trasferimento della sequenza di DNA per ottenere la sintesi completa dell'elica a partire dal 3' della regione appaiata.

Il filamento positivo viene sintetizzato a partire dal tratto compreso

fra il secondo innesco, localizzato in una zona ricca di purine da cui non viene completamente rimosso l'RNA, e l'estremità 3' dello stampo **(Freed, 2001)**.

Questi spostamenti della trascrittasi inversa da un filamento stampo all'altro comportano, a causa della bassa affinità dell'enzima per il suo substrato, la possibilità di ricombinazione e un alto tasso di mutazione genetica (3×10^{-5} per ciclo replicativo): questa eterogeneità nelle sequenze di HIV permette al virus di evadere il sistema immunitario dell'ospite e di sviluppare resistenza ai farmaci antiretrovirali **(Temin, 1993; Pathak e Hu, 1997; Mansky e Temin, 1995; Svarovskaia et al., 2003)**.

Durante la retrotrascrizione il genoma virale resta associato alla retrotrascrittasi. Successivamente, il DNA virale è trasportato al nucleo come complesso di pre-integrazione (PIC) costituito dalle proteine p17, p7, Vpr e dall'integrasi. La proteina della matrice p17 contiene due segnali di localizzazione nucleare (NLS) in grado di connetterla alle importine, mentre Vpr e l'integrasi sono dotate di NLS non convenzionali in grado di mediare il contatto diretto con il poro nucleare senza l'intervento delle importine **(Freed, 2001; Bukrinsky et al., 1993; Freed, 1998; Gallay et al., 1997)**.

In seguito al trasporto nucleare del PIC, l'integrasi catalizza l'inserzione del DNA virale bicatenario e linearizzato (provirus) all'interno del cromosoma cellulare.

Il processo di integrazione ha inizio quando l'integrasi elimina diversi nucleotidi dall'estremità 3' di entrambi i filamenti del DNA virale, generando estremità 3' recessive. L'integrasi catalizza anche un ampio taglio nel DNA cellulare e rimuove i nucleotidi spaiati al 5' del filamento virale. Infine gli enzimi di riparazione della cellula riempiono lo spazio eliminato dall'integrasi e la ligasi connette le sequenze cellulari al DNA provirale **(Chen et al., 1999; Wei et al., 1997; Farnet e Bushman, 1996)**.

Il provirus integrato può essere trascrizionalmente attivo oppure

rimanere in uno stato di latenza nei *reservoir* virali, costituiti da cellule (in particolare linfociti T CD4⁺ *memory*) in cui il virus non si replica e perciò non può essere rilevato dal sistema immunitario, né raggiunto dalla terapia. La latenza di HIV può dipendere dal sito di integrazione all'interno del genoma umano (come le regioni eterocromatiniche), dalle modifiche subite (ad esempio metilazione), da una bassa o assente espressione di Tat o Rev **(Siliciano e Siliciano, 2000)**; oppure può essere imputabile ad una scarsa stimolazione del promotore per la mancanza di fattori di trascrizione cellulari e virali **(Peterlin e Trono, 2003)**.

È stata documentata l'esistenza di alcuni fattori cellulari che sono in grado di limitare la trascrizione del virus e possono quindi facilitare questo stato di infezione non produttiva di HIV. YY1 ad esempio è un fattore di trascrizione ubiquitario in grado di inibire la trascrizione virale promossa dalle LTR: YY1 potrebbe essere coinvolto nell'acetilazione dei promotori.

Un altro fattore, LSF, possiede la capacità di bloccare la trascrizione delle LTR *in vitro*, ma non *in vivo*. È quindi possibile che la cooperazione di fattori di trascrizione cellulari contribuisca allo stabilirsi e al mantenimento di una popolazione di cellule infettate da HIV in modo stabile ma non produttivo **(Romerio et al., 1997)**.

2.6.3 Trascrizione

Il provirus integrato può essere trascritto per sintetizzare le proteine strutturali, regolatorie ed accessorie utilizzate per portare a termine la replicazione virale.

La trascrizione inizia sul sito di giunzione tra le regioni U3 e R del promotore virale (LTR). U3 contiene diversi elementi che mediano il legame tra RNA polimerasi II cellulare e DNA virale. Circa 25 nucleotidi a monte del sito di inizio della trascrizione è presente un elemento TATA al quale si lega il fattore di trascrizione TFIID. Al 5'

della TATA box si trovano i tre siti di legame Sp1 e i due siti NF- κ B, senza i quali la replicazione virale verrebbe bloccata. A monte dei siti NF- κ B è presente una regione modulatoria che contiene ulteriori siti di legame per diversi fattori di trascrizione **(Ross et al., 1991)**.

L'attività di trascrizione basale promossa dalle LTR è molto bassa; la sintesi di RNA aumenta invece con la presenza del transattivatore trascrizionale Tat **(Dayton et al., 1986; Fisher et al., 1986)**.

Tat recluta, infatti, l'eterodimero ciclina T1/cdk9 complessato al fattore di elongazione trascrizionale P-TEFb sul sito TAR e, grazie alla fosforilazione del dominio carbossiterminale della RNA polimerasi II, ottiene un aumento dei livelli di trascrizione **(Wei et al., 1998)**.

Gli RNA messaggeri virali così prodotti comprendono: RNA che non hanno ancora subito *splicing* (i messaggeri per Gag e per la poliproteina GagPol, che vengono assemblati nei nuovi virioni come RNA genomico), messaggeri che hanno subito *splicing* parziale (codificanti per Env, Vif, Vpu, Vpr) e piccoli messaggeri sottoposti a *splicing* multiplo (codificanti per Rev, Tat e Nef) **(Purcell e Martin, 1993; Pollard e Malim, 1998)**.

Dal momento che la maggior parte dei messaggeri cellulari viene processata completamente prima dell'uscita dal nucleo, risulta fondamentale il trasporto al citoplasma di messaggeri virali che non siano stati sottoposti a *splicing* completo, affinché il proteoma virale venga interamente assemblato. Questa funzione è garantita da una delle proteine regolatore di HIV, Rev.

Rev si lega alla struttura RRE presente sull'RNA codificante le proteine virali e media il trasporto al citoplasma di questi trascritti. In questo modo permette l'uscita dal nucleo di messaggeri più lunghi e il loro corretto processamento nel citoplasma per formare tutte le proteine virali **(Grewe e Ueberla, 2010)**.

2.6.4 Assemblaggio e liberazione delle particelle virali mature

Il fattore principale dell'assemblaggio della particella virale completa è il precursore di Gag, la poliproteina p55 (**Freed, 1998; Swanstrom e Wills, 1997**), che si lega alla membrana citoplasmatica, promuove l'assemblaggio dell'RNA virale nel capsido, si associa alle glicoproteine virali e stimola la gemmazione del virione dalla cellula (**Turner e Summers, 1999; Ivanchenko et al., 2009; Scarlata e Carter, 2003**).

Il dominio MA di Gag, situato all'estremità aminoterminale di p55, è responsabile del legame alla membrana plasmatica, per il quale l'aggiunta dell'acido miristico è fondamentale. MA si ripiega per esporre residui aminoacidici basici sul lato che viene giustapposto alla membrana, in modo che essi interagiscano con i fosfolipidi di quest'ultima, stabilizzando così il legame (**Zhou e Resh, 1996**).

La sequenza che promuove l'incapsidamento, ψ , è di solito localizzata al 5' del codone di inizio del messaggero di Gag (**Berkowitz et al., 1996**).

Il segnale di *packaging* è composto da 4 strutture a *stem-loop*, SL1-SL4, coadiuvate da sequenze presenti al di fuori di questa regione, che contribuiscono all'efficienza dell'incapsidamento e la cui specificità è data dalla loro struttura piuttosto che dalla sequenza nucleotidica. L'incapsidamento è mediato da interazioni tra il segnale di *packaging* e il dominio NC di Gag: NC contiene due motivi a *zinc finger* con sequenza Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₄-Cys, fiancheggiati da aminoacidi altamente basici. È stato proposto che NC funzioni da *chaperone* di acidi nucleici, permettendone il *folding* nella conformazione energeticamente più favorevole. Anche il dominio CA di Gag interviene nell'assemblaggio della particella virale (**Rein et al., 1998**).

Le proteine derivate da env vengono glicosilate attraverso il passaggio nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato del Golgi; infine colocalizzano sulla membrana in corrispondenza della poliproteina

Gag (**Freed, 1998**).

La tappa conclusiva del processo di assemblaggio del virus consiste nella gemmazione della particella virale dalla membrana della cellula ospite. Il virus possiede delle particolari sequenze che promuovono il rilascio del virus, dette sequenze *late* (L), presenti in p6 (**Huang et al., 1995**).

In seguito al rilascio del virus, la proteasi taglia le poliproteine Gag e GagPol per produrre le proteine strutturali definitive. Attraverso una serie ordinata e precisa di tagli, il processamento di Gag e Pol scatena una serie di modifiche strutturali che portano alla maturazione del virione. Morfologicamente il virione, che prima conteneva un centro elettronlucido, acquisisce un *core* conico elettrondenso, dovuto alla presenza di p24 (**Freed, 2001**).

2.7 Patogenesi di HIV

2.7.1 Eventi precoci per l'instaurarsi dell'infezione primari

Gli eventi correlati all'infezione primaria di HIV-1 sono critici nel determinare il corso della patologia ad esso associata.

Intervenire su questi eventi precoci significherebbe interferire direttamente con la patogenesi.

In tutto il mondo, la più frequente via di trasmissione del virus è quella sessuale (**Fauci, 2007**): la prima linea di difesa dell'ospite è rappresentata quindi dalla barriera della mucosa.

Uno dei meccanismi proposti per il passaggio di HIV attraverso la mucosa è la rottura delle giunzioni strette e il danno all'epitelio mucoso causato dall'infiammazione dovuta al contatto con HIV e con gp120 (**Nazli et al., 2010**).

In questo caso vengono interessate le cellule dendritiche localizzate sulla superficie mucosa dei siti coinvolti dal contatto con HIV.

Queste cellule legano con alta affinità la glicoproteina virale gp120 e

sono in grado di trattenere le particelle virali per giorni, così da facilitare il contatto del virus con altre cellule suscettibili all'infezione. Il ciclo replicativo di HIV inizia con il legame tra gp120 e la molecola CD4, che rappresenta il recettore virale sulla superficie delle cellule dell'ospite. Una volta stabilita la connessione, gp120 subisce una variazione nella sua conformazione, che le consente di legarsi facilmente a uno o più corecettori cellulari. Segue la fusione con la membrana cellulare e a questo punto l'infezione viene stabilita.

Precocemente si verifica un repentino e massivo incremento della viremia, che determina la disseminazione del virus ai tessuti linfoidi, in particolare a quelli associati ai visceri (GALT, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*).

Come risultato, viene instaurata un'infezione cronica e persistente, la quale rappresenta la principale caratteristica della patologia indotta dal virus HIV-1 (**Fauci e Lane, 2005**).

2.7.2 Attivazione immunitaria e immunodeficienza

Uno dei più rilevanti tratti distintivi della patogenesi di HIV-1 è l'importante deplezione dei linfociti T CD4⁺.

Il numero e la proporzione delle cellule T CD4⁺ nel plasma decrescono costantemente durante un periodo che può durare anni e questa progressiva perdita è associata allo sviluppo dell'AIDS negli individui infetti (**Levy, 1993**).

Il grado di immunodeficienza associato all'infezione da HIV, definito dall'instaurarsi di infezioni opportunistiche, correla con la conta dei CD4 e inoltre, riflette il livello di RNA virale nel plasma.

Tuttavia, la causa della deplezione dei CD4 non è da ricercarsi solamente nel tasso di replicazione virale o nell'azione diretta del virus sui linfociti T CD4⁺, ma è dovuta soprattutto all'attivazione persistente del sistema immunitario e all'infiammazione cronica che ne deriva (**Smith, 2006**).

L'attivazione del sistema immunitario nell'infezione da HIV è un processo che copre una vasta gamma di fattori coinvolti in eventi molecolari e cellulari (ad esempio attivazione, proliferazione e morte cellulare, secrezione di molecole solubili) e le loro conseguenze **(Appay e Sauce, 2007)**. Gli individui HIV-positivi mostrano un elevato numero di marcatori di attivazione e/o di apoptosi sulle cellule CD4⁺ e CD8⁺, sulle cellule B, sulle NK e sui monociti. Alti livelli di citochine, come il fattore di necrosi tumorale α (TNF α), l'interleuchina 6 (IL-6) e l'interleuchina 1 β (IL-1 β), si riscontrano sia nel plasma che nei linfonodi, già agli stadi precoci dell'infezione **(Finkel et al., 1995; Weiss et al., 1989)**.

La produzione di chemochine quali MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES, è particolarmente elevata in questi pazienti **(Canque et al., 1996)**.

L'attivazione immune, che normalmente riflette una normale e positiva risposta all'infezione di un qualunque patogeno, nel caso di HIV è invece una concausa della patogenesi: in diversi studi, i livelli di attivazione delle cellule T CD8⁺ sono risultati predittivi di una prognosi avversa nei pazienti HIV-positivi **(Giorgi et al., 1993)**.

L'instaurarsi dell'infiammazione e dell'attivazione immunitaria coinvolgono diversi meccanismi che sono sia direttamente che indirettamente correlati alla replicazione virale.

La principale causa dell'attivazione delle cellule T è la stimolazione antigenica data dal virus, che è l'evento chiave della risposta immune adattativa.

Durante l'infezione primaria, HIV-1 induce una potente risposta T-cellulare, soprattutto nelle cellule CD8⁺, che persiste nella fase cronica dell'infezione come conseguenza della continua replicazione virale **(Betts et al., 2001)**. Specifiche risposte da parte dei CD4 sono presenti, ma in misura molto minore a causa della deplezione che HIV induce selettivamente nella popolazione cellulare CD4⁺.

Tuttavia, l'entità dell'attivazione è tale da non poter essere spiegata solamente dalla stimolazione antigenica del virus. Infatti, anche i

prodotti dei geni virali possono indurre direttamente l'attivazione dei linfociti e dei macrofagi e la produzione di citochine e chemochine proinfiammatorie **(Appay e Sauce, 2007)**. Ciò è dovuto alla capacità delle proteine virali di innescare particolari processi infiammatori legandosi a bersagli preferenziali. Ad esempio, la proteina gp120 è in grado di attivare le cellule o di rafforzare la loro risposta all'attivazione, anche in assenza dell'infezione diretta, attraverso il legame alla molecola CD4 o a corecettori **(Rieckmann et al., 1991)**; Nef è in grado di attivare i linfociti in maniera diretta o tramite l'infezione dei macrofagi **(Swingler et al., 1999)**.

Inoltre, anche la proteina regolatoria Tat è nota per stimolare la produzione di citochine sia proinfiammatorie (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α) che anti-infiammatorie (IL-10), apportando il proprio contributo alla deregolazione immunitaria **(Haij et al., 2013)**.

Oltre a questi meccanismi diretti, HIV può indurre una imponente risposta immunitaria attraverso la riattivazione di infezioni pregresse da Cytomegalovirus (CMV) o da virus di Epstein-Barr (EBV).

In effetti, la deplezione dei linfociti T CD4⁺ porta ad allentare la sorveglianza immunologica delle infezioni persistenti come possono essere quelle di CMV o EBV, che sono frequentissime nella popolazione generale e asintomatiche in soggetti sani.

Di conseguenza, questi virus possono uscire dallo stato di latenza, replicare e attivare ulteriormente la popolazione T CD8⁺.

Perciò, durante l'infezione da HIV, una consistente attivazione immunitaria antigene-mediata indotta da HIV stesso è accompagnata da una stimolazione antigenica conseguente alla riattivazione di infezioni preesistenti **(Appay e Sauce, 2007)**.

2.7.3 Evasione del controllo immunitario

Le componenti del sistema immunitario dell'organismo ospite rivestono, come già accennato, sia un ruolo di difesa che un'importanza nella patogenesi dell'infezione da HIV-1. Durante le fasi iniziali dell'infezione virale viene attivata una complessa rete di fattori dell'immunità innata, i quali modulano la risposta all'infezione. Ciononostante, HIV-1 è stato in grado di evolvere e mettere in atto una serie di strategie per evadere il controllo immunitario dell'ospite. Una di queste è l'abilità di esprimere antigeni (PAMPs, *Pathogens-Associated Molecular Patterns*) non facilmente riconoscibili dai PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) dell'ospite, riuscendo così a evitare la risposta antivirale proinfiammatoria. La variabilità genetica è una delle maggiori strategie di elusione della risposta immune adottate dal virus: il genoma virale può essere alterato per sfuggire al riconoscimento immunitario, grazie alle mutazioni introdotte dalla trascrittasi inversa virale che manca di un sistema di proof-reading. L'azione neutralizzante degli anticorpi viene quindi elusa attraverso l'ipervariabilità della sequenza primaria dell'*envelope*, l'estensiva glicosilazione delle proteine pericapsidiche e il riarrangiamento strutturale degli epitopi.

Una ulteriore modalità di evasione è costituita dalla compromissione del sistema del complemento. Ad esempio, gp41 è in grado di legare la componente C1q, mentre gp120 induce una diminuzione dell'espressione di C5a: questi eventi portano ad una diminuzione dell'espressione dei recettori per il complemento e rendono poco efficace la risposta chemotattica dei monociti agli stimoli infiammatori. Tutte le proteine di HIV-1 svolgono un ruolo nell'escape immunologico: Tat mima le chemochine cellulari e funge da chemoattraente per monociti e macrofagi; Nef aumenta l'espressione delle citochine proinfiammatorie e regola negativamente l'espressione delle molecole HLA A e B, reprimendo così l'attività delle cellule NK; Vpr altera i livelli delle citochine infiammatorie; Vpu interagisce con la

teterina per facilitare la fuoriuscita del virione dalla cellula e Vif causa la degradazione di APOBEC3G (**Guha e Ayyavoo, 2013**).

L'evasione del virus dal controllo immunitario permette la costituzione di una riserva di cellule infette che non possono essere eliminate dalle cellule citolitiche dell'ospite.

2.8 Long-term non-progressors e Long-term survivors

Nel tipico decorso clinico dell'infezione da HIV si osserva un fase acuta, un periodo di latenza clinica e infine uno stadio di malattia conclamata caratterizzato da un'aumentata suscettibilità a infezioni opportunistiche e a particolari neoplasie. La fase acuta progredisce verso la fase clinica di latenza nella maggior parte dei pazienti infetti, nonostante una vigorosa risposta cellulo-mediata specifica per HIV, che insieme alla risposta umorale limita la replicazione virale. Il periodo di latenza clinica varia considerevolmente tra i pazienti HIV-positivi e l'insorgenza della sindrome da immunodeficienza acquisita si verifica in media dopo 8-10 anni.

Tuttavia, esiste un gruppo di soggetti infetti che non sviluppano mai l'AIDS o che progrediscono in un tempo molto più esteso del normale (**Pantaleo et al., 1995**). Questi pazienti sono chiamati *Long-term non-progressors* (LTNP), mantengono l'infezione asintomatica per molti anni con una conta di CD4⁺ e CD8⁺ nei valori normali e una viremia entro le 10000 copie/ml. I fattori che intervengono nel controllo dell'infezione dei LTNP sono di ordine virologico, genetico e immunologico. Rispetto alla componente virologica, alcuni LTNP vengono infettati da ceppi di HIV-1 che portano geni mutati per nef, vpr o rev. Per quanto riguarda fattori genetici, tra i LTNP sono stati descritti portatori del polimorfismo CCR5-Δ32 in eterozigosi, portatori della mutazione in omozigosi SDF1-3'A e della mutazione in eterozigosi per RANTES-28G. Tra gli aspetti immunologici sono stati osservati gli alleli HLA di classe I B57 e B27 che potenzia la

presentazione di peptidi antigenici sulla superficie delle cellule infette. **(Betts et al., 2006; Poropatich e Sullivan, 2011).**

Per queste ragioni, i LTNP potrebbero essere modelli ideali per lo sviluppo di vaccini, data la loro naturale capacità di controllare l'infezione **(Poropatich e Sullivan, 2011).**

Una piccola percentuale (<1%) di LTNP, denominati *Elite Controllers* oppure *Elite Suppressors*, mantiene i livelli di viremia sotto il limite di rilevabilità (20 copie/ml) per un periodo di tempo variabile da alcuni mesi a molti anni **(Poropatich e Sullivan, 2011; Piacentini et al., 2009).**

In letteratura sono stati descritti anche soggetti definiti come *Long-term Survivors* (LTS), che possiedono un livello di CD4⁺ (<500 cellule/ μ l) minore e una viremia maggiore rispetto ai LTNP. **(Poropatich e Sullivan, 2011).** I LTS sono in grado di mantenere una buona risposta cellulare T citotossica (CTL) specifica per una vasta gamma di antigeni di HIV anche dopo 10 anni dall'infezione e pare che sia proprio questa capacità (in particolare la risposta CTL verso Pol) a determinare il tasso di progressione della malattia in questi soggetti **(Betts et al., 1999).**

2.9 Patologie sistemiche

Il complesso quadro delle interazioni tra il virus e l'ospite, l'attivazione cronica del sistema immunitario e l'infiammazione persistente danno origine a uno scenario in cui si affacciano, con sempre maggiore frequenza, comorbidità rappresentate da patologie multiorgano. L'introduzione della terapia antiretrovirale ha trasformato l'infezione da HIV in una malattia cronica e ha aumentato l'aspettativa di vita dei pazienti HIV-positivi. Tuttavia, un'aspettativa di vita più lunga espone questi soggetti all'invecchiamento e a patologie quali il diabete mellito, neoplasie, danni a carico del rene, del fegato, del tessuto osseo, dell'encefalo e del sistema

cardiovascolare (**Castronuovo et al., 2013**).

2.9.1 Nefropatie

Con l'avvento della terapia antiretrovirale, che ha migliorato l'aspettativa di vita dei pazienti HIV-positivi, hanno iniziato ad emergere patologie renali croniche, che sono divenute frequentemente causa di morbidità e mortalità tra la popolazione HIV-positiva nei paesi industrializzati (**Ando et al., 2012**).

Le nefropatie correlate ad HIV sono caratterizzate da specifici danni renali e sono stati studiati numerosi fattori di rischio, tra i quali il genere maschile, l'etnia, la somministrazione di droghe per via endovenosa, la coinfezione con il virus dell'epatite C (HCV), una bassa conta cellulare dei CD4 e la progressione verso l'AIDS conclamata.

Con l'introduzione della terapia antiretrovirale, la prevalenza del danno renale causato direttamente dal virus è significativamente diminuita.

Eppure, il miglioramento in termini di sopravvivenza nei pazienti HIV-positivi porta all'accumulo di fattori dannosi alla funzione renale, quali l'invecchiamento, comorbidità come l'ipertensione, il diabete, l'iperlipidemia e non da ultimi, gli effetti avversi dei farmaci stessi.

I fattori sopra descritti hanno contribuito ad alzare nuovamente la frequenza di disfunzione renale sia acuta che cronica (**Déti et al., 2010; Krawczyk et al., 2004**).

2.9.2 Danno epatico

Sin dall'introduzione della cART, si è verificata una sostanziale diminuzione dei decessi correlati allo sviluppo dell'AIDS. Tuttavia, nell'era della terapia antiretrovirale, la patologia epatica è oggi la più comune causa di morte tra i pazienti HIV-infetti (**Price e Thio,**

2010). Gli eventi patologici di maggiore rilevanza sono causati specialmente da epatiti croniche dovute a coinfezione con i virus dell'epatite B (HBV) e C (HCV), da carcinoma epatocellulare, da steatoepatite non alcolica e da epatotossicità correlata alla terapia.

Inoltre, infezioni acute da virus dell'epatite A e infezioni croniche da virus dell'epatite E sono state descritte come causa di danno epatico in pazienti HIV-positivi (**Puoti et al., 2012**).

La maggior parte delle lesioni epatiche in pazienti infetti da HIV è secondaria alla coinfezione con HCV o HBV. Gli individui infetti sia da HIV che da HCV sono soggetti a una più rapida evoluzione verso la fibrosi epatica e un rischio più alto di sviluppare cirrosi (**Price e Thio, 2010**).

Inoltre, la coinfezione con HCV o HBV, insieme ad altri cofattori quali l'ipertensione e il diabete, incrementa il rischio per la progressione verso il carcinoma epatocellulare (**Puoti et al., 2012**).

Infine il danno epatico, in termini di tossicità epatica, rappresenta il più comune evento avverso associato alla cART.

I principali meccanismi attraverso i quali la terapia può causare lo sviluppo di lesioni epatiche sono quattro: una tossicità diretta dovuta ai farmaci e al loro metabolismo, reazioni di ipersensibilità, la tossicità mitocondriale e la sindrome infiammatoria da immunoricostituzione (IRIS, *Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome*).

La IRIS è caratterizzata dal paradossale peggioramento di una preesistente infezione in seguito alla ricostituzione del sistema immunitario risultante dalla soppressione dell'RNA di HIV, che porta a una rapida progressione verso la cirrosi epatica in caso di coinfezione con HCV.

Nonostante tutti i farmaci antiretrovirali rappresentino un fattore di rischio per l'epatotossicità, alcuni risultano essere maggiormente coinvolti nello sviluppo del danno epatico, come alcuni inibitori non nucleotidici della trascrittasi inversa, tra i quali Efavirenz, Etravirina e

Nevirapina e gli inibitori della proteasi di più recente introduzione come il Tipranavir (**Price e Thio, 2010**).

2.9.3 Osteopenia e osteoporosi

La prevalenza di osteopenia e osteoporosi è particolarmente elevata nei soggetti HIV-infetti.

L'osteoporosi è definita in generale come un disordine scheletrico sistemico caratterizzato dalla diminuzione della massa ossea e da un deterioramento della microarchitettura del tessuto osseo.

L'eziologia dell'osteoporosi negli individui infetti da HIV è multifattoriale: infatti, oltre ai tradizionali fattori di rischio, anche la terapia, l'infiammazione cronica dovuta all'infezione e fattori patogenetici del virus HIV stesso contribuiscono alla perdita di massa ossea (**Castronuovo et al., 2013**).

I pazienti condividono con la popolazione generale alcuni fattori di rischio, come la bassa densità di massa ossea, uno stile di vita sedentario, fumo, abuso di alcol, terapie a base di glucocorticoidi e insufficiente assunzione di calcio e vitamina D. Oltre a ciò, l'abbassamento delle difese immunitarie e l'infiammazione cronica, insieme ai farmaci antiretrovirali, hanno dimostrato di condizionare negativamente l'omeostasi ossea (**Castronuovo et al., 2013; McComsey et al., 2010; Tebas et al., 2000; Brown, 2013**).

L'integrità del tessuto osseo è mantenuta grazie all'attività di diverse citochine e di altre molecole solubili, ed è consolidata da un sistema neuroendocrino (ormone adrenocorticotropo, ormone paratiroideo PTH, calcitonina). In particolare, il sistema del PTH è molto importante, in quanto regola la produzione della citochina proinfiammatoria IL-6 e di RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand*), fattore fondamentale per il controllo del metabolismo osseo, che è il risultato dell'equilibrio tra il riassorbimento della matrice ossea operato dagli osteoclasti e la sua

sintesi ad opera degli osteoblasti (**Gibellini et al., 2010; Castronuovo et al., 2013**).

Questo equilibrio viene perso durante l'infezione da HIV, in quanto il riassorbimento e il ripristino osseo non risultano più accoppiati, a causa sia di danni diretti del virus che dei meccanismi proinfiammatori. Tra i danni diretti citiamo le proteine gp120 e vpr che promuovono l'attività degli osteoclasti, mentre p55-gag è in grado di sopprimere l'attività degli osteoblasti e di aumentarne l'apoptosi. Per quanto riguarda invece le conseguenze dell'infiammazione, le citochine proinfiammatorie come TNF α e IL-6 sono in grado di stimolare l'osteoclastogenesi RANKL-mediata.

Questo processo è stato associato ad elevati livelli di RNA virale e di attivazione T-linfocitaria. Normalmente l'osteoclastogenesi è regolata anche tramite l'azione dell'Interferon- γ , che è un potente inibitore fisiologico di RANKL; tuttavia l'espressione di IFN- γ risulta fortemente diminuita in corso di infezione da HIV.

Quindi, una limitata capacità di sopprimere l'espressione di RANKL risulta nell'aumento dell'osteoclastogenesi e di conseguenza in un drammatico incremento del riassorbimento osseo (**Castronuovo et al., 2013; Fakruddin e Laurence, 2004; Gibellini et al., 2007**).

A fianco agli effetti diretti e immuno-mediati dell'infezione da HIV, differenti molecole antiretrovirali sono state associate alla perdita di massa ossea, anche se i meccanismi e il grado di riassorbimento osseo variano dipendentemente dalla classe di farmaci (**McComsey et al., 2010**).

In particolare, sembra che regimi terapeutici che impiegano il Tenofovir o gli inibitori della proteasi virale, causino una più significativa perdita di massa ossea, rispetto al trattamento con gli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (**Bedimo et al., 2012; Gibellini et al., 2010**).

2.9.4 Patologie del sistema nervoso centrale

L'infezione di HIV a livello del sistema nervoso centrale (SNC) avviene precocemente. La demenza associata all'infezione da HIV-1 è una demenza subcorticale caratterizzata da severo declino cognitivo, rallentamento psicomotorio e disturbo comportamentale **(Wright, 2009; Liner et al., 2010)**.

L'infezione del SNC non prevede l'infezione diretta dei neuroni, ma è dovuta al potere neurotossico delle proteine virali rilasciate dalle cellule gliali infettate, che mediano il vasto danno neuronale. La glicoproteina gp120 è una potente neurotossina, le cui proprietà sono state studiate *in vitro* in colture cellulari e *in vivo* in animali da esperimento. A concentrazioni picomolari, gp120 è in grado di determinare la morte di cellule dei gangli dell'ippocampo, nei neuroni corticali e negli astrociti nel ratto, e in cellule cerebrali fetali umane.

Gp120 può inoltre innescare la produzione di radicali liberi dell'ossigeno, causando un danno ossidativo alle cellule. L'azione neurotossica di gp120 sui neuroni viene mediata dagli astrociti e dalle cellule della microglia.

La proteina di transmembrana gp41 può indurre l'aumento dell'ossido nitrico sintetasi inducibile, portando le cellule alla morte a causa della formazione dell'ossido nitrico. Per indurre questo effetto sui neuroni necessita delle cellule gliali **(Nath e Geiger, 1998)**.

Una ulteriore causa del danno cerebrale è rappresentata dalla proteina regolatoria Tat, implicata nella disfunzione cognitiva HIV-indotta. Tat può attivare i recettori dell'N-metil-aspartato, alterare l'omeostasi del calcio e incrementare lo stress ossidativo nei neuroni. Tat viene secreta attivamente dalle cellule gliali infette, lega i recettori di superficie dei neuroni e vi penetra attraverso un endolisosoma, in seguito ad endocitosi mediata da recettore **(Hui et al., 2012)**.

2.9.5 Patologie cardiovascolari

Le patologie cardiovascolari (come aterosclerosi e infarto del miocardio) si presentano con un'incidenza particolarmente elevata tra i pazienti HIV-positivi, in presenza o meno di terapia antiretrovirale.

L'aterosclerosi è una patologia cronica di tipo infiammatorio a carico delle pareti arteriose, che sono costituite da cellule endoteliali e da cellule muscolari lisce.

Segni subclinici di aterosclerosi, quali l'ispessimento della tonaca intima/media delle carotidi, delle arterie iliaca e femorale, sono significativamente più frequenti e progrediscono precocemente tra i pazienti HIV-infetti, rispetto alla popolazione generale.

I fattori di rischio per l'aterosclerosi nel contesto dell'infezione da HIV sono sia quelli tradizionali (quali età, fumo, diabete mellito, ipercolesterolemia, assenza di attività fisica), che HIV-specifici (coinfezione con HCV, bassa conta dei CD4 e particolari regimi terapeutici).

Tre processi biologici sono principalmente implicati nella progressione del processo aterosclerotico: l'infiammazione, la trasformazione dei monociti in macrofagi e poi in cellule "schiumose" e l'apoptosi di queste che porta allo sviluppo di placche ateromatose. Infatti, l'infiammazione sistemica associata all'infezione causa un esteso danno all'endotelio vascolare e nelle placche aterosclerotiche si riscontra la presenza di numerosi macrofagi e in misura minore, di cellule dendritiche, cellule T e B e cellule NK (**Shrestha et al., 2014**).

Una ulteriore conseguenza dell'infezione sul sistema vascolare è rappresentata dalla deregolazione della coagulazione.

L'azione pro-coagulante potrebbe essere causata direttamente dalla replicazione di HIV e dall'attivazione del sistema immunitario, anche se non ne sono ancora stati descritti i meccanismi (**Baker e Lundgren, 2011**).

Infine, anche la terapia antiretrovirale sembra ricoprire un ruolo di

rilevanza nell'esacerbare l'incidenza dei disturbi cardiovascolari in concomitanza dell'infezione da HIV (**Bozzette, 2011**).

Nei primi studi per trovare una possibile correlazione tra terapia e patologie cardiovascolari, non si notava alcun aumento significativo nella frequenza, suggerendo che trattamenti a breve termine non inducevano l'incidenza di disturbi vascolari. Al contrario, osservazioni su pazienti in terapia per periodi molto lunghi hanno messo in luce una diretta correlazione tra il trattamento a lungo termine e l'insorgenza di malattie cardiovascolari (**Gibellini et al., 2012 a**).

Tra tutte le classi di farmaci utilizzati nei regimi antiretrovirali, sembra che gli inibitori della proteasi virale siano quelli che più facilitano l'insorgenza di aterosclerosi, probabilmente per il loro effetto sul metabolismo lipidico (**Currier et al., 2008**).

2.10 Terapia antiretrovirale

A metà degli anni '90, la disponibilità di differenti farmaci antiretrovirali ha reso possibile l'introduzione di vari trattamenti ottenuti dalla combinazione di diverse classi di molecole. Questo approccio è stato definito come terapia antiretrovirale altamente efficace (*Highly Active Antiretroviral Therapy*, HAART) **(Blanco e Clotet, 2013)**.

L'avvento della HAART è stato decisivo per la riduzione della morbilità e della mortalità associate all'infezione da HIV-1 e all'AIDS. Il regime terapeutico basato su una combinazione di tre farmaci esercita un potente effetto sulla replicazione virale, riducendola sotto i limiti di rilevabilità dei saggi clinici più sensibili e di conseguenza, sulla conta dei linfociti T CD4⁺ circolanti. La terapia che combina molecole dirette contro almeno due obiettivi molecolari distinti è la base di partenza per la prevenzione della resistenza farmacologica. Infatti, il successo della HAART è in parte dovuto proprio alle combinazioni, che diminuiscono sensibilmente la probabilità di selezionare cloni virali con diverse mutazioni. Nel 2010 le linee guida europee hanno rivisto i termini di idoneità per la terapia e hanno raccomandato l'inizio della HAART con una conta dei CD4 pari a 350 cellule per millilitro. Con l'adeguata aderenza, la HAART può sopprimere la replicazione virale per decenni, aumentando drasticamente l'aspettativa di vita degli individui infetti, anche se non è in grado di eradicare l'infezione **(Arts e Hazuda, 2012)**.

I farmaci antiretrovirali sono distinti in sei classi, in base al loro meccanismo molecolare:

1. inibitori nucleosidici/nucleotidici della trascrittasi inversa (NRTI/NtRTI)
2. inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI)
3. inibitori dell'integrasi
4. inibitori della proteasi (PI)
5. inibitori della fusione

6. antagonisti dei recettori (o inibitori dell'*entry* virale)

Gli NRTI sono analoghi sintetici dei nucleotidi richiesti per la sintesi del genoma virale e competono con i nucleotidi naturali per l'incorporazione nella catena del DNA nascente. Tuttavia, sia gli analoghi nucleosidici sia quelli nucleotidici presentano un gruppo ossidrilico in meno rispetto ai nucleotidi naturali, perciò impediscono l'allungamento del filamento di DNA nascente, causandone un arresto prematuro **(Hartman e Buckheit Jr., 2012)**.

Gli NRTI sono stati i primi farmaci ad essere introdotti nella pratica clinica.

Vengono somministrati come pro-farmaci, che richiedono la fosforilazione da parte delle cellule dell'ospite per diventare farmacologicamente attivi.

Gli NNRTI ostacolano l'azione della trascrittasi inversa virale legandosi ad essa e inducendo la formazione di una tasca idrofobica prossima al sito attivo dell'enzima: questo legame modifica la conformazione spaziale del sito di legame al substrato e riduce l'attività polimerasica. Gli inibitori dell'integrasi impediscono l'incorporazione del DNA provirale nel genoma cellulare **(Arts e Hazuda, 2012)**.

Gli inibitori della proteasi sono strutturalmente simili alla poliproteina virale, substrato della proteasi, ma l'enzima non è in grado di tagliare la loro sequenza: viene quindi impedita la maturazione delle proteine fondamentali per l'assemblaggio di nuove particelle virali infettanti **(Arend et al., 2013)**. Dal momento che la proteasi è un componente vitale nel ciclo di HIV, inizialmente si credeva che l'insorgenza di resistenze ai PI sarebbe stata rara. Eppure, il gene che codifica per la proteasi virale è dotato di grande plasticità ed esistono diversi polimorfismi che sono in grado di instaurare resistenza ai farmaci **(Hartman e Buckheit Jr., 2012; Arts e Hazuda, 2012)**.

Il Ritonavir è un PI attivo a concentrazioni nanomolari, noto anche come un potente inibitore degli enzimi della famiglia dei citocromi P4503A. Grazie a questa funzione, il Ritonavir rallenta il metabolismo

degli altri antiretrovirali e aumenta la loro biodisponibilità nelle cellule. Tale caratteristica lo ha reso frequentemente impiegato in combinazione insieme ad altri PI, rendendone possibile l'assunzione in dosi minori e meno frequenti (**Arend et al., 2013**).

La classe degli inibitori della fusione è rappresentata da un unico composto, l'Enfuvirtide, che lega la proteina virale gp41 e le impedisce di inserirsi nella membrana cellulare. L'ultima classe di farmaci in uso clinico è rappresentata dal Maraviroc, un antagonista del corecettore cellulare CCR5. Il Maraviroc compete con la gp120 per il legame al CCR5, ed impedisce il legame di HIV-1 alla cellula bersaglio (**Hartman e Buckheit Jr., 2012**).

3. LA STRUTTURA VASCOLARE E L'ENDOTELIO

I vasi sanguigni originano nell'embrione in seguito alla vasculogenesi, attraverso il differenziamento di progenitori non differenziati (angioblasti) in cellule endoteliali che si dispongono a formare una struttura primitiva.

Attraverso l'espansione e il rimodellamento di questa rete di canali iniziale, prende forma una struttura più complessa, che reclutando anche cellule muscolari lisce, accrescendosi e maturando porta all'origine dei vasi **(Khurana e Simons, 2003)**.

Il tessuto di rivestimento dei vasi, l'endotelio, è costituito da tre strati concentrici formati da varie tipologie cellulari. La tonaca intima, che si affaccia sul lume del vaso, è composta da cellule endoteliali; la tonaca media contiene diversi strati di cellule muscolari lisce e la tonaca avventizia consiste in tessuto stromale e adiposo, e contiene i *vasa* e i *nerva vasorum* **(Psaltis et al., 2011)**.

L'omeostasi delle pareti dei vasi è fondamentale per garantirne l'integrità e la funzionalità, compresi il mantenimento di un'adeguata pressione sanguigna e di un appropriato tono vascolare **(Torsney e Qingbo, 2011)**.

Svariati processi fisiologici e patologici nell'adulto, come la rigenerazione tissutale, la rimarginazione delle ferite e anche la crescita tumorale, necessitano della formazione di nuovi vasi **(Ergün et al., 2011; Jain, 2005)**.

In condizioni fisiologiche, il ricambio delle cellule vascolari, ovvero delle cellule endoteliali e delle cellule muscolari lisce, è basso, ma aumenta considerevolmente in seguito ad eventi patologici che causano un danno vascolare **(Torsney e Qingbo, 2011)**.

Il deterioramento delle pareti vascolari è associato alla patogenesi di vari processi morbosi, inclusi l'aterosclerosi, la formazione di aneurismi o di vasculiti, che nel tempo possono portare all'insorgenza di ischemia o di infarto **(Psaltis et al., 2011)**.

Le cellule vascolari mature sono reputate in grado di proliferare e di sostituire quelle danneggiate.

Inoltre, si ritiene che anche cellule staminali o progenitori vascolari possano intervenire nella riparazione dei danni vascolari.

E' stato messo in evidenza come tutti e tre gli strati del tessuto endoteliale di rivestimento ai vasi, la tonaca media, la tonaca intima e la tonaca avventizia, contengano progenitori vascolari, inclusi progenitori endoteliali e cellule mesenchimali **(Torsney e Qingbo, 2011)**.

In passato si riteneva che nell'adulto fosse possibile esclusivamente il rimodellamento di vasi preesistenti (angiogenesi); ora, invece, con il recente isolamento di putativi precursori endoteliali dal sangue periferico e dalle pareti dei vasi negli organismi adulti, si è fatta strada la possibilità che la vasculogenesi (formazione di vasi *de novo*) giochi un ruolo importante nella formazione di nuovi vasi nei tessuti maturi **(Khurana e Simons, 2003)**.

Evidenze sperimentali hanno dimostrato come questi progenitori possano differenziare verso filiere cellulari alternative, a seconda degli stimoli che ricevono **(Torsney e Qingbo, 2011)**.

Fino ad ora non è stata possibile una caratterizzazione univoca dei progenitori endoteliali sulla base di marcatori molecolari, in quanto non possiedono un preciso profilo molecolare che li distingua in maniera netta dalle cellule endoteliali mature o dai precursori ematopoietici. Sono infatti molto limitati i marcatori endoteliali specifici, come pure i saggi funzionali in grado di distinguere i progenitori dalle cellule endoteliali mature derivate dalle pareti vascolari o dalle cellule ematopoietiche **(Khurana e Simons, 2003)**.

I progenitori endoteliali in senso stretto (*EPC, Endothelial Progenitor Cells*) sono caratterizzati dalla clonogenicità, dall'automantenimento, dall'alto potenziale proliferativo, dall'abilità di aderire alle molecole della matrice extracellulare e dalla capacità di differenziare in cellule endoteliali mature e funzionali **(Psaltis et al., 2011)**.

I vari approcci per operare la discriminazione tra EPC e cellule endoteliali mature o ematopoietiche comprendono la coltura *ex vivo*, la formazione di colonie di EPC e la selezione basata su marcatori molecolari.

Una delle varie strategie utilizzate relativamente all'approccio con i marcatori di superficie, è la selezione negativa delle cellule commissionate alla filiera ematopoietica (CD45, CD11, CD3...), per ottenere una popolazione che presumibilmente contenga i progenitori endoteliali **(Khurana e Simons, 2003)**.

Tuttavia, l'insieme dei marcatori utilizzati normalmente per identificare le EPCs manca di specificità, in quanto sono tutti compresi tra gli antigeni di superficie delle cellule endoteliali e tra quelli delle cellule ematopoietiche.

Come conseguenza, esiste una forte variabilità genotipica nei putativi progenitori che sono stati esaminati per la loro capacità vasculogenica nei differenti studi affrontati in letteratura **(Psaltis et al., 2011; Asahara et al., 1997)**.

Nella tabella seguente è indicato l'insieme dei marcatori che permette di distinguere la popolazione di cellule indicate come precursori endoteliali **(Tabella 1)**.

Tabella 1 Analisi fenotipica dei progenitori endoteliali

	Putativi progenitori endoteliali EPC	Cellule endoteliali da parete	Cellule ematopoietiche
VEGF-R1 (Flt-1)			+
VEGF-R2 (Flk-1/KDR)	+	+	+
VEGF-R3	+		
FGFR1	+	+	
Tie-2	+	+	+
VE-Cadherin (CD144)	+	+	+
E-Selectin	+/-	+	+
CD34	+/-	+	+
CD31 (PECAM-1)	-	+	-
AC133	+	-	+
Sca-1	+	-	
cKit	+	+	+
CD13		+	+
Von Willebrand Factor	-	+	
CXCR-4	+	+	+

Lo spazio bianco indica che l'espressione di quel particolare antigene non è stata ben documentata nella linea cellulare presa in considerazione (**Khurana e Simons, 2003**).

3.1 Progenitori endoteliali da pareti vascolari

Negli ultimi anni è cambiata la concezione tradizionale della biologia vascolare, che riteneva le cellule dei vasi adulti già differenziate in maniera definitiva e le considerava come quiescenti.

Sono state osservate, infatti, popolazioni cellulari immature, elementi staminali o progenitori, appartenenti alla filiera delle cellule endoteliali, delle cellule mesenchimali multipotenti, delle cellule muscolari lisce (**Tintut et al., 2003**).

Queste sottopopolazioni hanno dimostrato di partecipare attivamente alla vasculogenesi postnatale e al rimodellamento vascolare nei tessuti adulti, in quanto mostrano un alto potenziale proliferativo e clonogenico, essendo in grado di formare colonie di EPC *in vitro* (**Ingram et al, 2005**).

Tali progenitori sono stati isolati dalle pareti dei vasi embrionali, fetali e anche dalle strutture vascolari adulte, dove è possibile che risiedano in maniera costitutiva, oppure che vi arrivino come risultato della migrazione cellulare data dalla circolazione sanguigna (**Psaltis et al., 2011; Tintut et al., 2003**).

La definizione di una precisa nicchia dove i progenitori endoteliali potrebbero essere localizzati non è semplice; eppure, sempre più evidenze sperimentali suggeriscono l'esistenza di una "zona vasculogenica" situata tra lo strato della muscolatura liscia e quello della tonaca avventizia, all'interno della parete vascolare stessa, nei vasi di medio e di grosso calibro.

Queste cellule sono perciò state definite come progenitori endoteliali residenti nelle pareti vascolari (VW-EPC, *Vascular Wall resident Endothelial Progenitor Cells*).

Le VW-EPC possiedono la capacità di migrare e formare capillari: durante questo processo acquisiscono marcatori endoteliali come i recettori del *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGFR1 e 2), il *von Willebrand Factor* (vWF) e diventano positive rispetto alle molecole di adesione intercellulare, come Tie-2, VE-caderina e CEACAM1, dimostrando la loro predeterminazione a diventare cellule endoteliali (**Zengin et al., 2006; Khurana e Simons, 2003**).

I progenitori endoteliali derivati dal midollo osseo mostrano, con l'avanzamento dell'età, un declino proliferativo e una diminuzione nella propria capacità migratoria (**Scheubel et al., 2003**), condizioni in parte causate dai bassi livelli di VEGF nel plasma durante la senescenza (**Dimmeler e Zeiher, 2004**).

Al contrario, le EPC residenti nelle zone vasculogeniche (VW-EPC) non sono direttamente esposte allo stress da attrito (*shear stress*), essendo localizzate lontano dal lume del vaso, dove la forza e la pressione esercitate dalla circolazione sanguigna agiscono invece sulle EPC circolanti e sulle cellule endoteliali mature.

Tale area localizzata all'interno della parete vascolare contiene anche

cellule staminali multipotenti che possono differenziare in macrofagi e probabilmente anche in progenitori ematopoietici. E' quindi possibile ipotizzare che la zona vasculogenica non solo serve come fonte di cellule endoteliali per formare nuovi vasi e ripristinare l'endotelio danneggiato, ma che sia anche una riserva per cellule che vengono attivate per la risposta immune/infiammatoria locale (**Zengin et al., 2006**).

3.2 La nicchia di residenza delle VW-EPC

Per meglio definire la localizzazione della nicchia di appartenenza delle cellule residenti nelle pareti, sarà qui brevemente trattata la struttura dei vasi sanguigni.

Le strutture vascolari di dimensione minore, i capillari, sono costituiti da due strati cellulari, le cellule endoteliali a contatto col lume del vaso e i periciti, una componente contrattile che ricopre in maniera non continua la parete capillare.

Le EC e i periciti sono a stretto contatto le une con gli altri e si dipartono dalla medesima membrana basale.

Le arteriole e le venule, pur essendo di dimensioni paragonabili a quelle dei capillari, comprendono almeno uno strato di cellule muscolari lisce, al posto dei periciti.

Tutte queste strutture microvascolari sono avvolte da tessuto connettivo che le integra nel tessuto perivascolare.

La parete dei grossi vasi come le arterie e le vene è invece organizzato, come già detto, in tre strati concentrici: la tonaca intima, media e avventizia.

Lo strato più interno a contatto col lume vascolare, la tonaca intima, è formata, come i capillari, da EC, la media soprattutto da cellule muscolari lisce e l'avventizia da cellule del connettivo.

Mentre per la microvascolatura l'apporto di ossigeno e nutrimento viene direttamente dal sangue circolante, per i vasi di grosso calibro è

presente una rete di vasi aggiuntiva (*vasa vasorum*) che, situata nella tonaca avventizia, provvede al nutrimento di vene e arterie (**Ergün et al., 2011**).

In condizioni normali, tutti i componenti delle pareti vascolari sono in fase quiescente, ma sotto la spinta di opportuni stimoli, sia fisiologici che patologici, le cellule endoteliali possono migrare e proliferare (**Carmeliet, 2005**).

In alcuni casi è stato descritto l'accumulo di cellule positive all'alpha actina della muscolatura liscia, tuttavia non è stato chiarito se queste cellule derivino da cellule muscolari mature preesistenti nelle pareti arteriose o da precursori (**Orlandi e Bennett, 2010**).

Fino a pochi anni fa, la tonaca avventizia non era stata presa in considerazione riguardo un possibile ruolo nell'angiogenesi o nella vasculogenesi postnatale.

Al contrario, numerose evidenze sperimentali hanno invece riconosciuto questa componente della parete vascolare (sia in arterie che in vene, nel feto e nell'adulto) come la nicchia che accoglie differenti tipologie di cellule staminali e di cellule progenitrici, identificate nell'insieme come cellule residenti nelle pareti vascolari, che comprendono EPC, progenitori delle cellule muscolari lisce, cellule staminali mesenchimali (MSCs, *Mesenchymal Stem Cells*) e cellule staminali ematopoietiche (**Ergün et al., 2011**).

Questo strato della parete vascolare funge da interfaccia tra lo strato più interno (intima) e il tessuto perivascolare. Una folta documentazione riporta l'intensivo rimodellamento dell'avventizia nell'arteria polmonare, indotto dall'ipossia e dalla reazione infiammatoria già durante lo stadio iniziale dell'aterosclerosi (**Frid et al., 2006**).

In questo distretto vascolare sono inoltre state identificate anche le cellule staminali implicate in neoplasie maligne come le leucemie e i tumori gliali (**Calabrese et al., 2007; da Silva Meirelles et al., 2006**).

Il complesso quadro appena descritto suggerisce come la nicchia della tonaca avventizia, oltre che essere sede di progenitori e di cellule staminali multipotenti fondamentali per la produzione di nuovi vasi e per il rinnovo delle pareti vascolari, sia anche implicata nella crescita di tumori e nella degenerazione tissutale data da eventi patologici come l'aterosclerosi.

La parete dei vasi, in particolare lo spazio periendoteliale della microvascolatura e la tonaca avventizia dei vasi di medio e grosso calibro, è quindi una struttura particolarmente ricca in differenti tipologie cellulari, progenitori multipotenti delle MSC e delle cellule staminali ematopoietiche, progenitori con la capacità di differenziare in cellule mature della parete stessa, in cellule del sangue e in cellule organo-specifiche (**Ergün et al, 2011**).

3.3 Cellule staminali mesenchimali residenti nelle pareti vascolari

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono precursori adulti multipotenti che possiedono l'intrinseca capacità di differenziare in diverse filiere cellulari, inclusi i condrociti, gli osteociti, gli adipociti, i miociti e le cellule stromali del midollo osseo (**Pittenger et al., 1999**).

Nonostante il potenziale differenziativo delle cellule staminali adulte sia stato a lungo creduto ristretto al tessuto d'origine, recentemente ne è stata riconosciuta l'abilità di originare cellule differenziate di altri organi e tessuti, come cellule epatiche, renali e cardiache (**Forbes et al., 2002**), anche se l'interpretazione è spesso controversa.

Le più studiate e caratterizzate sono le MSC derivate dal midollo osseo, ma le MSC possono essere ottenute dalle più disparate sedi nell'adulto, nel feto, nel fluido amniotico, nella placenta, nelle cellule cordonali (**Covas et al., 2003; Romanov et al., 2003**). In generale, si ritiene che sia virtualmente possibile isolarle da tutti gli

organi **(da Silva Meirelles et al., 2006; da Silva Meirelles et al., 2008)**.

La documentata dimostrazione della stretta relazione trovata tra le MSC e le cellule perivascolari potrebbe costituire la prova del perché queste cellule possano essere isolate da tutti i tessuti.

Invero, l'associazione delle MSC con le strutture vascolari permetterebbe loro di attuare il fisiologico ricambio cellulare e di essere disponibili alla rigenerazione dei tessuti in caso di lesione **(da Silva Meirelles et al., 2008)**.

Inizialmente, l'integrazione delle MSC nella struttura vascolare ha portato a identificarle come periciti o cellule derivate da essi, ma l'evidenza sperimentale ha messo in discussione questa ipotesi e ha dimostrato invece l'esistenza di una popolazione di MSC residente nelle pareti dei vasi, colocalizzate con i periciti maturi nella microvascolatura del tessuto adiposo **(Lin et al., 2008)**.

Queste cellule costituiscono perciò una filiera cellulare distinta, che non possiede i marcatori dei periciti (come ad esempio l'alpha actina e altri antigeni propri della muscolatura liscia) e che è negativa per i marcatori della linea ematopoietica (CD34, CD45, CD133), monocitica (CD14) e per i marcatori delle cellule endoteliali mature, come VEGFR2-, caderina 5 e CD31 **(Covas et al., 2005; Pasquinelli et al., 2007)**.

Le MSC, analizzate al citometro a flusso per i marcatori di superficie, sono invece caratterizzate come positive per CD13, CD29, CD44, CD54 **(Covas et al., 2005)**, CD90, CD73, CD105 **(Ergün et al., 2007; Pasquinelli et al., 2007)** e per l'HLA di classe I **(Covas et al., 2005)**.

In coltura, le MSC hanno mostrato un fenotipo stabile **(Covas et al., 2005)** e una grande plasticità **(da Silva Meirelles et al., 2008)**.

Se coltivate in presenza di desametasone e acido ascorbico, differenziano in cellule della filiera osteogenica; mentre in coltura con insulina, desametasone e indometacina, danno origine alla filiera

adipocitica. Durante i vari differenziamenti, le MSC esprimono i marcatori molecolari afferenti alla tipologia cellulare nella quale sono state indotte e che non possedevano in precedenza **(Covas et al., 2005)**.

Nelle MSC isolate da vena safena sono espressi in maniera più significativa, rispetto a MSC di altra origine, i geni per l'interleuchina 8 e per la metalloproteinasi 2 della matrice, geni correlati all'angiogenesi **(Li et al., 2003)**.

L'espressione di tali geni è nota anche nelle cellule endoteliali isolate dalla vena cordonale, osservazione che rafforza l'ipotesi che le MSC siano di particolare rilevanza nella fisiologia e nella formazione delle strutture vascolari **(Covas et al., 2005)**.

4. OBIETTIVO DELLA TESI

L'infezione da HIV-1 resta ancora oggi una delle principali problematiche nell'ambito della sanità mondiale, con circa 35 milioni di individui infetti in tutto il mondo. L'introduzione della terapia antiretrovirale combinata (cART) ha drasticamente modificato l'evoluzione di questa infezione, che da patologia a sviluppo terminale dopo alcuni anni dalla trasmissione, è diventata una patologia cronica con una lunga aspettativa di vita per i pazienti. Nonostante questo indubbio successo, la cART non è in grado di eradicare l'infezione e nei pazienti HIV-infetti trattati è possibile notare un aumento della comparsa di patologie come il diabete mellito, l'aterosclerosi, l'osteoporosi e differenti neoplasie. Tra le comorbidità più frequentemente riscontrate nel contesto di un'infezione da HIV-1 a lungo termine si annoverano lesioni al sistema nervoso centrale, ai reni, al tessuto osseo, al fegato e al sistema cardiovascolare.

I danni relativi al sistema cardiocircolatorio derivano da una serie di concause virologiche, comportamentali, ambientali e farmacologiche che alterano la parete vascolare, il metabolismo dei lipidi e la regolazione della coagulazione, inducendo la formazione di lesioni strutturali di tipo aterosclerotico che sono alla base dell'aumentata incidenza di infarti, ictus e alterazioni del circolo osservabili nei pazienti HIV-positivi.

La recente letteratura ha prodotto una dettagliata documentazione su come l'omeostasi del tessuto endoteliale sia regolata anche a livello delle cellule staminali mesenchimali (MSC) presenti nella parete vascolare. Per questo abbiamo voluto analizzare possibili effetti dell'infezione di HIV, delle sue proteine e di alcune molecole antiretrovirali sulla vitalità e sul differenziamento delle MSC purificate dalla parete arteriosa umana.

I risultati ottenuti indicano come l'infezione da HIV e l'azione di alcune proteine come gp120 e Tat attivino il meccanismo di apoptosi

nelle MSC e una profonda alterazione nel differenziamento verso la filiera adipocitaria e verso quella endoteliale. Inoltre, è stato possibile notare come alcune molecole ad azione antiretrovirale (in particolare specifici inibitori della proteasi virale) riescano a bloccare il differenziamento delle MSC verso le cellule endoteliali. L'insieme di queste osservazioni rappresenta, a nostra conoscenza, la prima analisi sperimentale degli effetti patogenetici di HIV e di alcuni farmaci antiretrovirali sulle MSC purificate da parete arteriosa umana. Questo studio permette, inoltre, di evidenziare nuovi meccanismi patogenetici correlati al danno vascolare HIV-indotto che possono a loro volta diventare oggetto di successiva analisi per mettere a punto un'azione farmacologica specifica.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Isolamento e differenziamento delle MSC

Segmenti di arteria femorale, arteria carotide comune e arco aortico provenienti da donatori multiorgano a cuore battente (di sesso maschile di età compresa tra i 25 e i 60 anni), sono stati processati per analisi di immunoistochimica e utilizzati per l'isolamento delle cellule staminali mesenchimali (MSC), come già descritto in letteratura (**Pasquinelli et al., 2007**).

Le MSC isolate sono state caratterizzate tramite citometria a flusso e analisi del potenziale di differenziamento (**Pasquinelli et al., 2010**). Le cellule sottoposte a citofluorimetria, provenienti dai passaggi 3-5, sono state staccate tramite trattamento con tripsina e sono state lavate due volte con tampone salino fosfato (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) contenente siero fetale bovino (*Fetal Calf Serum*, FCS; Gibco, Paisley, UK). Le cellule sono state trattate per 20 minuti a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi monoclonali (mAbs): fluoresceina isotiocianato (FITC)-anti-CD29, ficoeritrina (PE)-anti-CD34, FITC-anti-CD44, FITC-anti-CD45, FITC-anti-CD73, PE-anti-CD90, PE-anti-CD105, PE-anti-CD146, PE-anti-CD166 e FITC-anti-KDR (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Sono stati allestiti controlli isotipici per verificare la specificità dei legami osservati.

Le cellule sono state lavate più volte in PBS e analizzate al citometro *Cytomics FC500 Flow Cytometer* (Beckman Coulter).

Le MSC isolate sono state seminate ad una densità di circa 5×10^3 cellule/cm², mantenute in coltura in terreno D-MEM (Lonza, Basilea, Svizzera) con il 10% di FCS ed espanse ogni 4 giorni a circa il 70% di confluenza.

Per l'espansione delle colture sono state utilizzate fiasche da 75 cm² e da 25 cm² (Becton Dickinson, Palo Alto, CA) preventivamente trattate con collagene (Sigma, St. Louis, MO) (**Pasquinelli et al., 2007**); mentre per gli esperimenti, cellule dal quarto all'ottavo passaggio

sono state seminate in piastre non collagenate da 6 o 24 pozzetti (Nunc, Rochester, NY). Per indurre il differenziamento adipogenico, cellule confluenti al 100% sono state poste in coltura in piastre non collagenate e sono state sottoposte a tre cicli costituiti da 3 giorni in terreno di induzione e 3 giorni in terreno di mantenimento (*Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium kit*, Lonza). Dopo pochi giorni le cellule hanno iniziato a formare vacuoli di lipidi neutri e sono state trattate con una soluzione colorante di *Oil Red O* (Sigma) **(Alviano et al., 2007)**. Come controllo negativo per il differenziamento sono state impiegate cellule in coltura con solamente il terreno di mantenimento.

Il differenziamento verso cellule endoteliali è stato ottenuto ponendo in coltura cellule confluenti al 100% in DMEM con 2% di FCS e 50 ng/ml di *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF; Invitrogen, Carlsbad, CA) per 7 giorni, cambiando il terreno ogni 2 giorni. Cellule in terreno senza VEGF costituivano il controllo negativo **(Alviano et al., 2007)**.

Cellule della linea linfoblastoide C8166, utilizzate per la produzione del virus e come controllo per l'infezione virale, sono state mantenute in RPMI 1640 (Lonza) con il 10% di FCS mentre le cellule NK-92 sono state mantenute in terreno α -MEM (Gibco) con il 15% di FCS, il 15% di siero equino e 20 U/ml di IL-2 ricombinante umana (Peprotech, Londra, UK). Monociti del sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) sono stati acquisiti da donatori sani, dai quali era stato precedentemente ottenuto il consenso informato secondo la dichiarazione di Helsinki. Queste cellule sono state mantenute in coltura in RPMI 1640 con il 10% FCS o attivate con fitoemoagglutinina (PHA) 5 μ g/ml (Sigma) e IL-2 10 U/ml.

5.2 Stock virali e protocolli di infezione

Stock virali di HIV-1_{IIIB} e di HIV-1_{Ada} sono stati prodotti rispettivamente dall'infezione di cellule C8166 e di PBMC e titolati utilizzando *ELISA HIV-1 p24 antigen kit* (Biomerieux, Marcy L'Etoile, Francia).

L'inattivazione del virus mediante calore, dove richiesta, è stata ottenuta mediante un trattamento a 65°C per 30 minuti. Le MSC sono state poste a contatto con il virus per 2 ore a 37°C con HIV-1_{IIIB} e HIV-1_{Ada} al 50-60% di confluenza, utilizzando una concentrazione di p24 pari a 5ng/ml. In seguito le cellule sono state lavate una volta con PBS e mantenute in coltura; il surnatante è stato prelevato a tempi specifici. Come controllo sono state utilizzate MSC tenute a contatto per 2 ore a 37°C con ceppi di HIV-1 preventivamente trattati per 30 minuti a 37°C con 20µl di anticorpo policlonale (pAb) anti-gp120 di coniglio (NIBSC, Potters Bar, UK). Per gli esperimenti di infezione è stata effettuata la titolazione di p24 con *ELISA HIV-1 p24 antigen kit* (Biomerieux).

Alcuni esperimenti con colture di MSC subconfluenti sono stati condotti con HIV-1 inattivato al calore (*Heat Inactivated*, hiHIV) o con gp120 ricombinante (rgp120) 1 µg/ml (NIBSC); il virus è stato mantenuto a contatto con le cellule per 2 ore a 37°C, mentre la proteina non è stata eliminata dalla coltura.

Come controllo, le MSC sono state trattate con 1 µg/ml di p24 (NIBSC), con HIV-1, con hiHIV-1 o con rgp120 pretrattata per 30 minuti a 37°C con 20µl di pAb anti-gp120 di coniglio.

Negli esperimenti sul differenziamento delle MSC, il virus o le proteine virali sono stati aggiunti prima dell'induzione con i terreni specifici e ad ogni cambio di terreno, fatta eccezione per il virus non inattivato che è stato mantenuto a contatto con le cellule solamente per 2 ore a 37°C prima del differenziamento.

A tempi predefiniti in seguito al trattamento, le cellule sono state staccate con tripsina, raccolte e analizzate.

5.3 Trattamento delle colture cellulari con Tat

La proteina ricombinante Tat intera (100ng/ml; Diatheva, Pesaro) è stata aggiunta alle colture cellulari contemporaneamente all'induzione del differenziamento adipogenico o endoteliale e aggiunta ad ogni cambio di terreno. Per il differenziamento adipogenico le raccolte cellulari sono state fatte a 3, 7, 10, 14 e 21 giorni, mentre per quello endoteliale a 7 giorni dall'induzione.

In alcuni esperimenti sono stati aggiunti alle colture differenziate verso l'endotelio, singolarmente e ad ogni cambio di terreno, diversi peptidi di Tat (100ng/ml dei residui aminoacidi 1-20, 11-30, 21-40, 31-50, 41-60, 51-70, 61-80, 74-86; NIBSC).

Come controllo, le MSC differenziate sono state trattate con la proteina p24 (100ng/ml; NIBSC) e con Tat pretrattata con anticorpo policlonale anti-Tat (pAB, 5µg/ml; NIBSC).

5.4 Saggio di integrazione e rilevamento del DNA provirale

Sono stati estratti il DNA cellulare e quello provirale con l'utilizzo del *DNeasy kit* (Qiagen, Hilden, Germania), i quali sono stati amplificati utilizzando i *primers* SK431 e SK462 per il gene gag, come descritto precedentemente (**Gibellini et al., 2008**).

A seguito dell'amplificazione è stato possibile visualizzare un prodotto specifico di 142 bp mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%.

Il DNA provirale è stato analizzato previa purificazione da gel del DNA genomico cellulare, seguito da una Alu-PCR *nested* (**O'Doherty et al., 2002**).

Per la prima amplificazione sono stati utilizzati *primers* specifici per le sequenze Alu e gag, mentre per la seconda sono stati scelti *primers* più interni, corrispondenti alle LTR virali. Mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2.5% è stato identificato un amplicone di 100 bp.

5.5 Saggi di amplificazione con RT-PCR

Si è proceduto all'estrazione degli RNA messaggeri totali da MSC, PBMC, NK-92 e da cellule batteriche di E.coli Dh5 α (come controllo negativo) tramite *High Pure RNA Isolation kit* (Roche, Basilea, Svizzera).

L'RNA totale (100 ng) è stato retrotrascritto e amplificato con il kit *Quantitect SYBR Green RT-PCR* (Qiagen) in un *Light Cycler* (Roche), utilizzando 400 nM di oligonucleotidi con sequenze specifiche per β -actina (controllo positivo per l'amplificazione), CD4, CXCR4 e CCR5.

L'amplificazione è stata condotta attraverso una prima fase di retrotrascrizione (1 ciclo a 50°C per 20 minuti), un'attivazione *hot start* della Taq DNA Polimerasi (94°C per 15 minuti) e 40 cicli come segue: 94°C per 10 secondi, 60°C per 30 secondi, 72°C per 90 secondi.

Per l'amplificazione della β -actina l'*annealing* è stato fatto a 60°C per 15 secondi e l'*extension* a 72°C per 25 secondi.

Gli amplificati sono stati analizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1.5%.

L'amplificazione di c-kit, BCRP-1, Oct-4, Notch-1, Sox-2, BMI-1 e della β_2 -microglobulina è stata effettuata come descritto da Pasquinelli e collaboratori (**Pasquinelli et al., 2010**).

Per quantificare l'espressione dei geni coinvolti nell'adipogenesi e nell'endotelio-genesi, dalle cellule è stato estratto l'RNA totale (100 ng) che è stato in seguito retrotrascritto e amplificato con il *Quantitect SYBR Green RT-PCR kit* (Qiagen), utilizzando *primers* specifici.

L'amplificazione è stata effettuata attraverso un ciclo di retrotrascrizione a 50°C per 20 minuti, attivazione iniziale a 95°C per 15 minuti e 40 cicli come segue: 94°C per 10 secondi, 60°C per 15 secondi, 72°C per 30 secondi per C/EBP β , C/EBP δ , adiposina, PPAR γ ,

UCP-1, vWF, VEGFR-2 (KDR); mentre per VEGFR-1 (FLT-1) è stato aggiunto un passaggio a 78°C per 2 secondi.

Le relative quantificazioni sono state calcolate attraverso il confronto con specifiche curve standard esterne e la normalizzazione è stata eseguita tramite l'amplificazione della subunità ribosomiale 18s per ogni campione analizzato.

Per PPAR γ , UCP-1 e per la subunità ribosomiale 18s sono state utilizzate sequenze già note (**De Gemmis et al., 2006**).

Per gli altri geni quantificati sono state utilizzate le seguenti sequenze:

C/EBP β (178 bp)

5' TTCAAGCAGCTGCCCCGAGCC 3'

5' GCCAAGTGCCCCAGTGCCAA 3'

C/EBP δ (168 bp)

5' GTGCGCACAGACCGTGGTGA 3'

5' CGGCGATGTTGTTGCGCTCG 3'

vWF (115bp)

5' TAGCCCGCCTCCGCCAGAAT 3'

5' GTGGGCTGGAGGCCACGTTC 3'

VEGFR-1 (FLT-1) (195 bp)

5' GCCCTGCAGCCCAAACCCA 3'

5' CGTGCCACATGGTGCGTC 3'

VEGFR-2 (KDR) (192 bp)

5' GCGAAAGAGCCGGCCTGTGA 3'

5' TCCCTGCTTTTGCTGGGCACC 3'

5.6 Saggi sull'apoptosi

MSC non differenziate trattate con HIV-1 (5ng/ml p24), hiHIV-1, rgp120 (100ng/ml) e Tat (1-1000ng/ml), sono state lavate con PBS, distaccate con tripsina, fissate in etanolo 70% a 4°C per 15 minuti, lavate con PBS, trattate con RNasi 0.5 mg/ml (Sigma), trattate con ioduro di propidio 50µg/ml (Sigma) e analizzate al citofluorimetro *FacScan* (Becton-Dickinson, Palo Alto, CA) equipaggiato con laser ad Argon a 488 nm.

5.7 Analisi dei marcatori di superficie e intracellulari

Per l'analisi citofluorimetrica del CD4 di membrana sono stati utilizzati anticorpi monoclonali anti-CD4 coniugati con FITC (Becton-Dickinson). Anticorpi coniugati con FITC diretti contro antigeni non specifici sono stati considerati come controllo negativo.

Le cellule (1×10^5) sono state poste a contatto con gli anticorpi diluiti 1/20 in PBS a temperatura ambiente per 20 minuti; sono state lavate con PBS e analizzate al *Cytomics FC500* (Beckman-Coulter).

Per testare la presenza di CD4 intracellulare sono stati utilizzati anticorpi monoclonali anti-CD4 coniugati con FITC su cellule fissate con paraformaldeide al 2% e permeabilizzate con saponina allo 0.1%. L'analisi per gli specifici marcatori endoteliali è stata condotta mediante citometria a flusso su 1×10^5 cellule dopo 7 giorni in coltura, con gli anticorpi monoclonali FITC-VEGFR-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e FITC-VEGFR-2 (R&D System, Minneapolis, MI) diluiti 1/20 in PBS.

Per le analisi di espressione del vWF intracellulare le MSC sono state permeabilizzate con *Intraprep kit* (Beckman-Coulter), incubate con l'anticorpo monoclonale anti-vWF 1/20 in PBS (DakoCytomation, Glostrup, Danimarca) per un'ora a temperatura ambiente e successivamente incubati con l'anticorpo secondario anti-IgG-FITC diluito 1/40 in PBS (DakoCytomation) per 30 minuti a temperatura

ambiente. I dati relativi all'intensità di fluorescenza delle proteine di superficie sono stati acquisiti al *Cytomics FC500 Flow Cytometer* (Beckman-Coulter) e i risultati analizzati utilizzando il *CXP Software* (Beckman-Coulter).

5.8 Saggio sull'espressione di PPAR γ

L'espressione del fattore di trascrizione adipogenico PPAR γ è stata testata con il *TransAM PPAR γ kit* (Activ Motif, Carlsbad, CA). Questo è un saggio ELISA particolarmente sensibile che permette, in seguito all'estrazione delle proteine nucleari, la determinazione del legame di PPAR γ a specifiche sequenze consenso legate alla piastra. Il legame viene rilevato dalla reazione colorimetrica tra gli anticorpi anti-PPAR γ e gli anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano (HRP). La reazione colorimetrica è stata letta allo spettrofotometro a 450 nm e confrontata con una curva di concentrazioni normalizzata.

5.9 Trattamento delle colture cellulari con farmaci antiretrovirali

Su alcune colture cellulari di MSC differenziate verso la filiera endoteliale sono stati testati diversi composti antiretrovirali (NIBSC). La concentrazione utilizzata è la concentrazione media riscontrata nel plasma dei pazienti in terapia, come indicato nell' *Electronic Medicines Compendium* (<http://www.medicines.org.uk/emc/>).

COMPOSTO ANTIRETROVIRALE	CONCENTRAZIONE FINALE
TENOFOVIR	195.2ng/ml
EMTRICITABINA	945ng/ml
EFAVIRENZ	9.25μM
NEVIRAPINA	4.735μg/ml
RALTEGRAVIR	3μM
MARAVIROC	900ng/ml
RITONAVIR	560ng/ml
SAQUINAVIR	1.13μg/ml
NELFINAVIR	2.5μg/ml
ATAZANAVIR	2.56μg/ml
DARUNAVIR	9μg/ml

I composti sono stati aggiunti alla coltura cellulare contestualmente all'induzione del differenziamento e ad ogni cambio di terreno.

5.10 Analisi statistiche

I dati sono espressi come deviazione standard di tre esperimenti distinti. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il test *t di Student* a due code.

6. RISULTATI

6.1 Isolamento di cellule staminali mesenchimali umane da pareti arteriose

MSC umane sono state isolate e purificate dalle pareti di arteria femorale, arteria carotide comune e arco aortico di donatori multiorgano a cuore battente e sono state tipizzate con metodiche cellulari e molecolari.

L'analisi citofluorimetrica dei marcatori superficiali di membrana ha evidenziato la seguente caratterizzazione (**Fig. 1A**):

MARCATORE	ESPRESSIONE
CD29	+
CD44	+
CD73	+
CD90	+
CD105	+
CD166	+
VEGFR-2	a bassi livelli sempre espresso
CD34	-
CD45	-
CD146	-
von Willebrand Factor	-

Attraverso saggi di RT-PCR è stata riscontrata la presenza di geni distintivi della proprietà di staminalità, come Oct-4, c-kit, BCRP-1, Notch-1, Sox-2 e BMI-1 (**Fig. 1B**).

Inoltre, è stata ricercata la presenza dell'mRNA per le molecole che fungono da recettori e corecettori per il legame del virus alla superficie cellulare, CD4, CXCR4 e CCR5: sono presenti i messaggeri relativi a tutte queste molecole (**Fig. 2A**).

Tuttavia, la ricerca in citometria a flusso dell'espressione del CD4 sulla superficie delle MSC non è stata riscontrata.

E' stata perciò effettuata una permeabilizzazione della membrana cellulare, con la quale è stato possibile, attraverso l'utilizzo di appropriati anticorpi, riscontrare la presenza della molecola CD4 a livello intracellulare, in circa il 25% delle cellule (**Fig. 2B**).

Appare possibile che in questo tipo cellulare esista una particolare regolazione dell'espressione del CD4, che comunque non permette di escludere la presenza di CD4 funzionale sulla membrana cellulare, probabilmente a livelli inferiori ai limiti di rilevabilità della metodica.

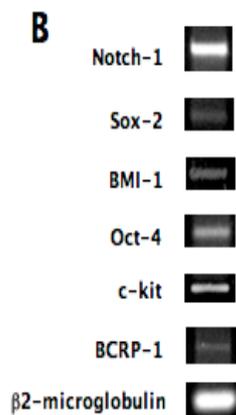
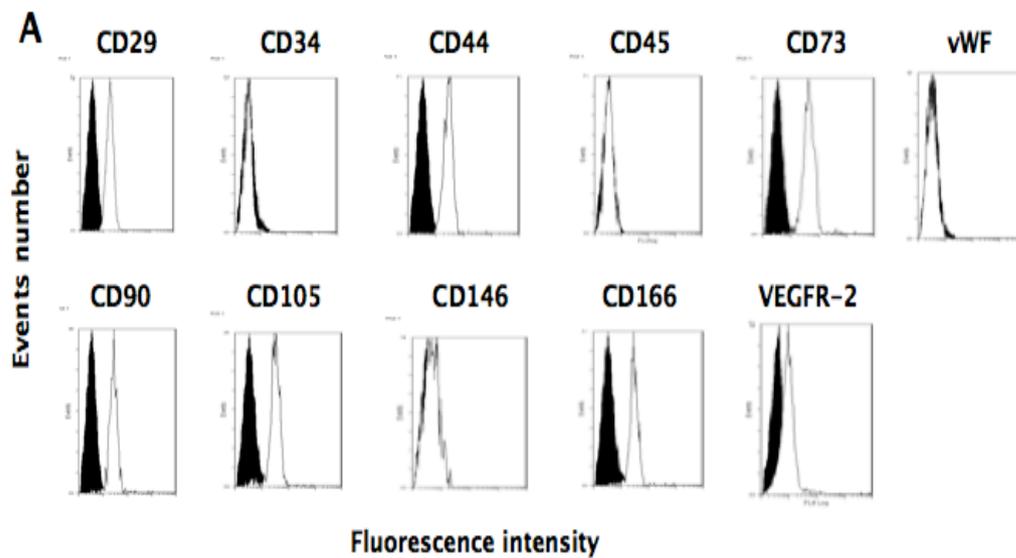


Figura 1 Espressione dei marcatori di superficie e dei geni per la staminalità

A. Analisi di citometria a flusso dei marcatori di membrana delle MSC isolate da pareti vascolari. L'area nera rappresenta il controllo negativo (controllo isotipico), mentre l'area bianca rappresenta le MSC legate agli anticorpi specifici per le molecole prese in esame.

B. Elettroforesi su gel di agarosio per i geni tipici delle cellule staminali.

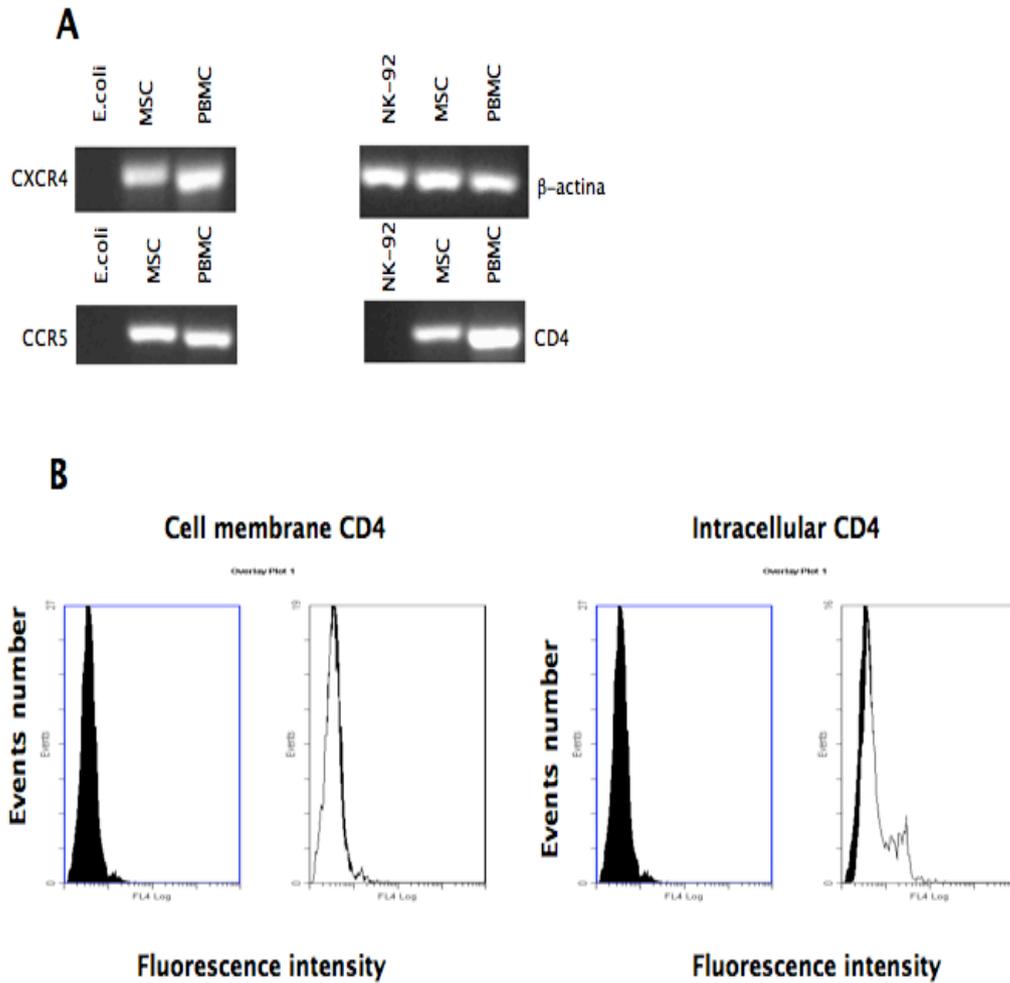


Figura 2 Espressione di CD4, CXCR4 e CCR5 nelle MSC

A. Elettroforesi su gel di agarosio che mostra i prodotti dei geni per il recettore e i corecettori di membrana nelle MSC. RNA totale estratto da cellule NK-92 per il CD4 e RNA totale da *E. coli* per CXCR4 e CCR5 come controlli negativi.

B. Citometria a flusso per la molecola CD4. A sinistra, espressione di superficie. A destra, livelli di CD4 intracellulare.

6.2 HIV-1_{IIIB} e HIV-1_{Ada} retrotrascrivono il proprio genoma e lo integrano nel DNA delle MSC

Sono stati scelti due ceppi di laboratorio a differente tropismo cellulare: uno con preferenza per la linea linfocitaria, HIV-1_{IIIB} e uno a tropismo monocitario, HIV-1_{Ada}.

In seguito al contatto con i due ceppi virali, le cellule sono state mantenute in coltura per 3 e 7 giorni, staccate con tripsina, raccolte e il loro DNA totale è stato estratto.

La presenza di DNA provirale integrato nel genoma cellulare è stato verificato attraverso due modalità.

La prima consta di una PCR per ricercare una specifica sequenza virale (**Fig. 3A**); la seconda metodica invece, una PCR *nested*, utilizza due amplificazioni, una per rilevare una sequenza cellulare (la sequenza ripetitiva Alu) adiacente a una virale (gag) e una seconda amplificazione che rileva un prodotto virale specifico (LTR) (**Fig. 3B**). Infine, tramite un saggio ELISA specifico, è stata titolata la proteina p24, indicatore di replicazione virale (**Fig. 3C**).

Dai risultati ottenuti alle condizioni sperimentali indicate, si evince che entrambi i ceppi virali siano in grado di legare le MSC, di entrare all'interno del compartimento cellulare e di retrotrascrivere il genoma virale in DNA provirale che ha la capacità di integrarsi nel patrimonio genetico cellulare. Eppure, i virus mostrano una scarsa capacità replicativa, in quanto i livelli di p24 quantificati nel surnatante delle colture cellulari tendono ad innalzarsi leggermente fino a 7 giorni dall'infezione, poi declinano rapidamente.

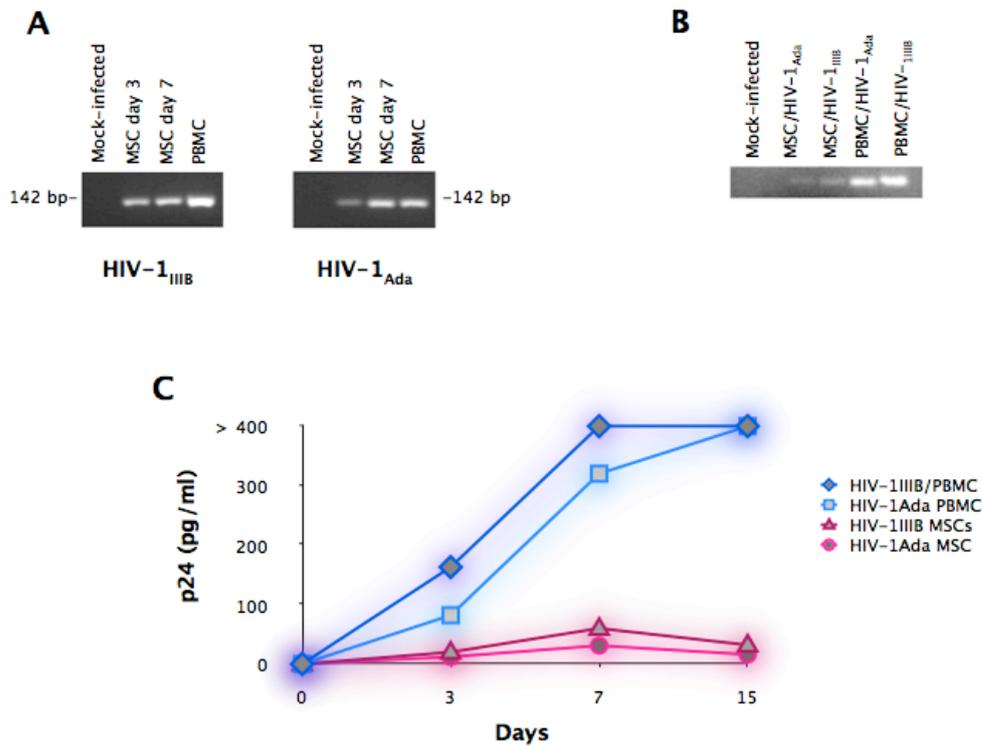


Figura 3 Infezione delle MSC e replicazione di HIV-1

A. Elettroforesi su gel di agarosio di DNA provirale da un’infezione con HIV-1_{IIIB} e HIV-1_{Ada} a 3 e 7 giorni. PBMC al giorno 3 dopo l’infezione come controllo positivo. MSC non infette come controllo negativo.

B. Prodotto di amplificazione di 100 bp che indica il DNA provirale integrato nella cellula al giorno 7 dall’infezione. PBMC attivati infettati come controllo positivo.

C. Analisi ELISA dell’antigene p24 nel surnatante di MSC e PBMC (controllo positivo). La concentrazione di p24 nel surnatante delle MSC decresce nel tempo.

6.3 HIV-1 e gp120 ricombinante inducono apoptosi in colture di MSC non confluenti

Il virus HIV-1 può indurre apoptosi tramite il legame tra gp120 e il recettore CD4 espresso sulla superficie delle cellule bersaglio.

MSC subconfluenti sono state infettate con entrambi i ceppi virali e sono state calcolate le percentuali di apoptosi mediante citofluorimetria, previa colorazione con ioduro di propidio.

È stato osservato un aumento della percentuale delle cellule apoptotiche nel tempo (**Fig. 4A**). Al giorno 3 è stato calcolato il $13.9 \pm 3.2\%$ per le cellule infettate con HIV-1_{IIIB} e $11.2 \pm 2.5\%$ per le cellule infettate con HIV-1_{Ada}, mentre per il controllo negativo la percentuale di cellule apoptotiche rilevata si aggirava attorno al $3.8 \pm 0.5\%$ ($p < 0.01$) e diminuiva al giorno 7 ($p < 0.05$).

Esperimenti analoghi condotti con rgp120 o con HIV-1 inattivato al calore hanno riportato risultati simili: valori di $11.8 \pm 2\%$ rispetto al $3.8 \pm 0.5\%$ del controllo al giorno 3 riferiti a rgp120 (**Fig. 4B**) suggeriscono che l'interazione tra la glicoproteina gp120 e la membrana cellulare gioca un ruolo diretto nell'infezione.

Infatti, se ai ceppi di HIV o alla proteina ricombinante veniva aggiunto un anticorpo di coniglio diretto contro la gp120 prima del contatto con la coltura cellulare, l'induzione dell'apoptosi subiva un marcato declino (**Fig. 4B**).

Successivamente, è stata condotta una serie di esperimenti per verificare le proprietà proapoptotiche di gp120 sulle MSC indotte verso il differenziamento in senso adipogenico o verso l'endotelio.

È risultato che né il virus (sia i ceppi biologicamente attivi sia quelli inattivati al calore), né la glicoproteina purificata sono stati in grado di determinare una significativa induzione dell'apoptosi, suggerendo che gli stimoli differenziativi potrebbero plausibilmente prevaricare il segnale negativo prodotto dal virus.

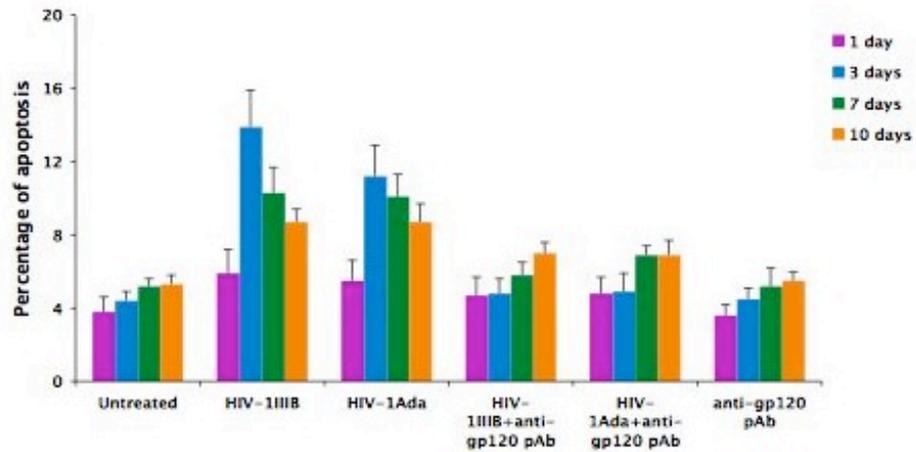
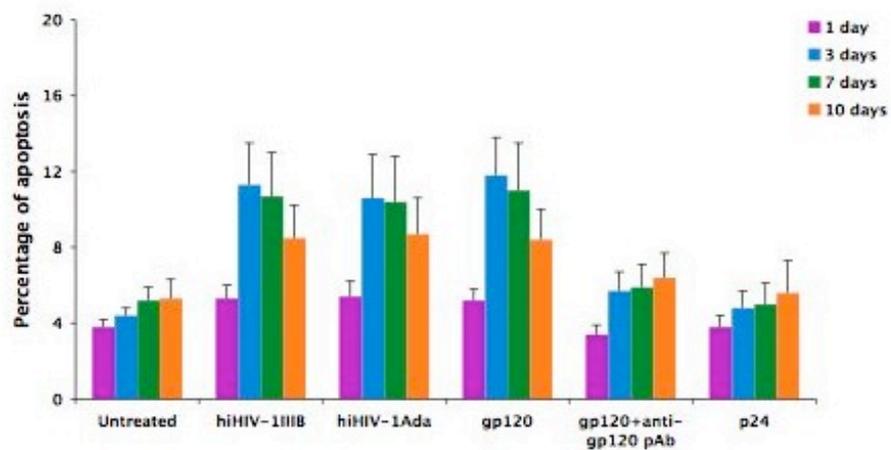
A**B**

Figura 4 HIV-1 e gp120 inducono apoptosi nelle MSC

A. Analisi di citometria a flusso con ioduro di propidio su MSC subconfluenti trattate con HIV-1.

B. Induzione dell'apoptosi in MSC trattate con hiHIV-1 e rgp120.

6.4 La proteina Tat ricombinante induce apoptosi in colture di MSC non a confluenza

La proteina Tat gioca un ruolo complesso nella patogenesi HIV-indotta, in quanto può essere secreta dalla cellula infetta per agire mediante circuiti autocrini e paracrini su cellule adiacenti la cellula che l'ha prodotta; perciò abbiamo verificato se la proteina transattivante Tat potesse indurre morte cellulare programmata nelle MSC. Alle colture cellulari non confluenti sono state aggiunte concentrazioni scalari di Tat (1-1000ng/ml) e ai giorni 1, 3 e 7 è stata analizzata la percentuale di cellule apoptotiche tramite citometria a flusso, previa marcatura con ioduro di propidio. E' stato rilevato un significativo aumento dell'apoptosi ($P < 0.05$) ai giorni 3 e 7 solo a concentrazioni di Tat uguali o superiori ai 200ng/ml, mentre concentrazioni inferiori di Tat mostravano solo un lieve ma non sostanziale decremento dell'apoptosi (**Fig.5**). L'azione era specifica in quanto un pretrattamento di Tat con l'anticorpo policlonale anti-Tat inibiva l'effetto biologico. Il trattamento con p24 o il pretrattamento di Tat con anticorpo policlonale anti-Tat non alteravano in alcun modo la sopravvivenza cellulare. Utilizzando il medesimo protocollo sperimentale su MSC a confluenza, differenziate verso il tessuto adiposo o verso quello endoteliale, non si è riscontrato un livello significativo di apoptosi.

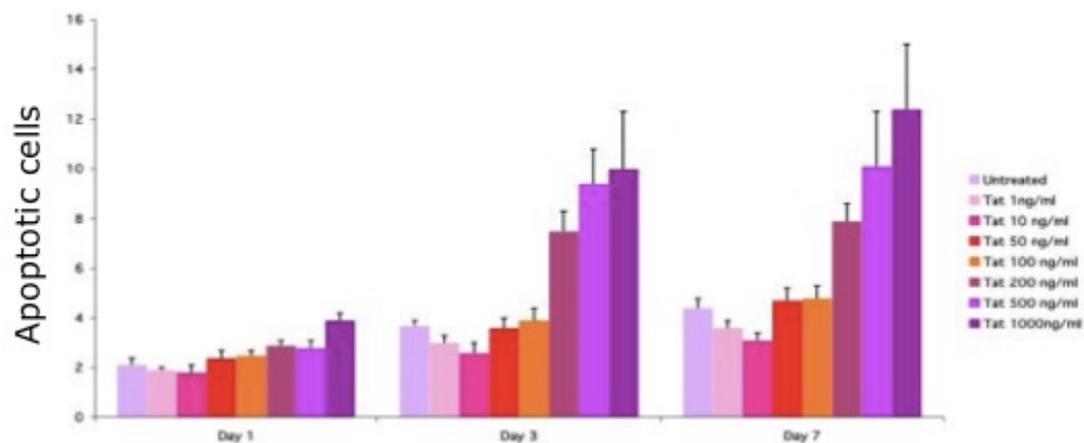


Figura 5 Tat ad alte concentrazioni induce apoptosi nelle MSC

Analisi di citometria a flusso di MSC trattate con Tat e marcate con ioduro di propidio.

6.5 HIV e gp120 ricombinante inducono un incremento del differenziamento adipogenico delle MSC

Per determinare gli effetti di HIV-1 sul differenziamento delle MSC, sono state studiate le interazioni tra il virus o la proteina gp120 e le cellule mesenchimali indotte verso il differenziamento adipogenico, stimolato da opportuni terreni di coltura.

L'adipogenesi è stata valutata a tempi diversi attraverso la colorazione diretta delle colture cellulari con *Oil Red O*, che ha mostrato un marcato incremento del differenziamento nelle colture trattate con HIV-1 o rgp120, in contrasto con colture non trattate di controllo (**Fig. 6**), indicando che HIV-1 e rgp120 causano un differenziamento più rapido e consistente.

È stato quindi effettuato un test ELISA con il kit *TransAM* per verificare l'espressione del più importante fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione dell'adipogenesi, PPAR γ . Al giorno 7 HIV-1_{IIIIB}, HIV-1_{Ada} e rgp120 inducono un aumento significativo dell'attività di PPAR γ (**Fig. 7A**) rispetto al controllo negativo (aumento di 3.4 ± 0.5 volte con HIV-1_{IIIIB}, 3 ± 0.4 volte per HIV-1_{Ada} e di 2.7 ± 0.5 volte con rgp120; $p < 0.05$).

L'aumento di PPAR γ non è stato osservato invece previo trattamento del virus e della glicoproteina con anticorpo monoclonale anti-gp120.

Analisi molecolari di *real time* RT-PCR su estratti di RNA totale delle cellule trattate hanno confermato l'aumento (**Fig.7B**) dell'mRNA di PPAR γ (2 ± 0.5 volte aumentato con HIV-1_{IIIIB}, 1.7 ± 0.3 volte per HIV-1_{Ada} e 1.8 ± 0.4 volte per rgp120; $p < 0.05$) rispetto ai controlli non trattati.

Inoltre è stata analizzata, in *real time* RT-PCR, l'espressione genica di altri marcatori dell'adipogenesi (**Fig.8**).

Le fasi più precoci del differenziamento dipendono dall'attivazione di C/EBP β e δ , che a loro volta attivano C/EBP α e PPAR γ , i quali portano

alla completa maturazione degli adipociti, fase caratterizzata dall'espressione di marcatori tardivi come adipsina e UCP-1.

HIV-1 e rgp120 al giorno 7 inducono un importante aumento dell'espressione di C/EBP β (8.2 ± 2.3 con HIV-1_{IIIIB}, 5.8 ± 1.4 con HIV-1_{Ada} e 4.7 ± 1.3 con rgp120; $p < 0.05$) e δ (3.6 ± 1.2 con HIV-1_{IIIIB}, 3.4 ± 1.3 per HIV-1_{Ada} e 3.5 ± 0.9 per rgp120; $p < 0.05$).

Come atteso, il preventivo trattamento con anticorpo anti-gp120 inibisce l'aumento dell'espressione dei geni interessati (**Fig. 8A**).

Lo studio su adipsina e UCP-1, condotto con metodiche di *real time* RT-PCR su mRNA estratti da cellule al decimo giorno di coltura, ha accertato che i ceppi virali e la glicoproteina modulano positivamente l'espressione del messaggero per l'adipsina. UCP-1, marcatore del tessuto adiposo bruno, è invece scarsamente espresso e i livelli del suo mRNA non mostrano alcuna variazione (**Fig. 8B**).

Si evince perciò che, alle nostre condizioni sperimentali, le MSC siano stimulate a produrre solamente tessuto adiposo bianco.

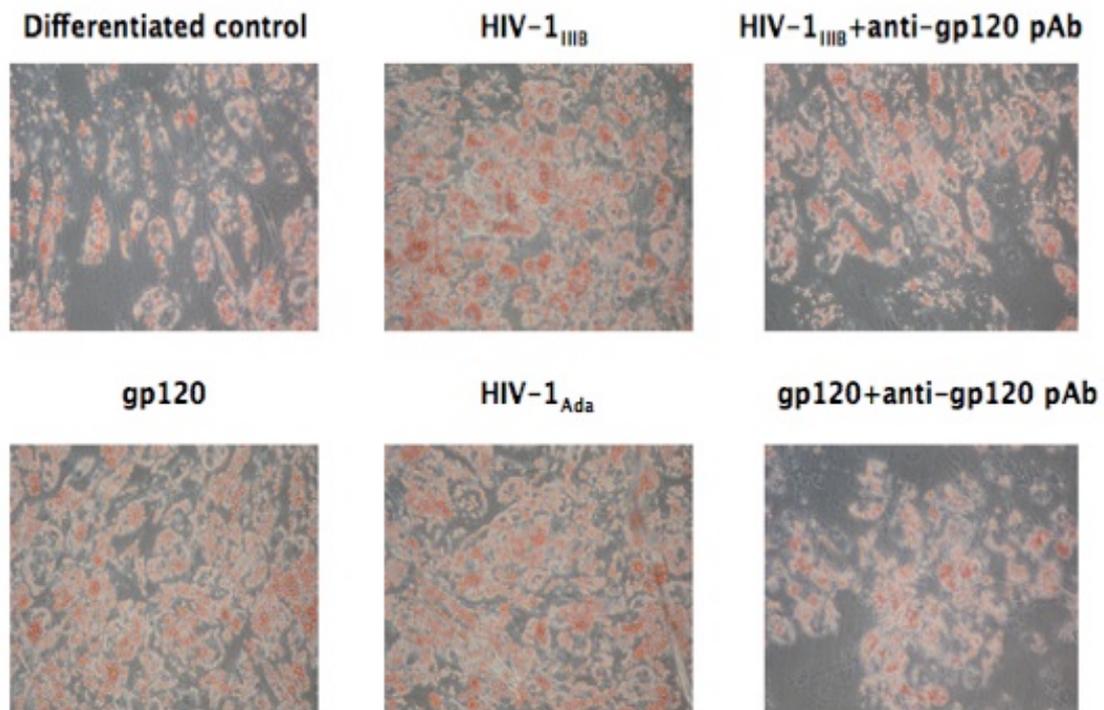


Figura 6 HIV e gp120 inducono un aumento nell'adipogenesi nelle MSC

Colorazione con *Oil Red O* di MSC differenziate non trattate, trattate con HIV-1_{IIIb}, con virus pretrattato con anticorpo anti-gp120, con proteina ricombinante gp120, con HIV-1_{Ada} e con gp120 pretrattata con anticorpo anti-gp120.

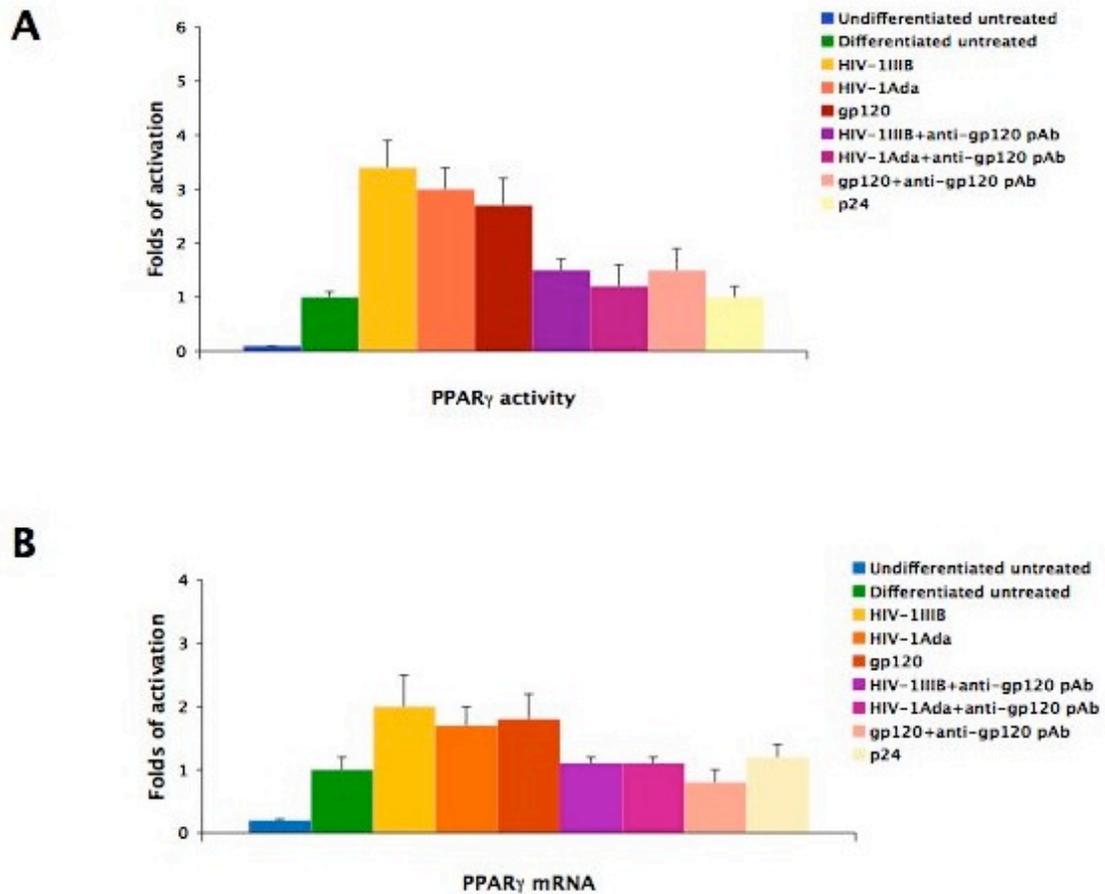


Figura 7 Saggi sull'attività e sull'espressione genica di PPAR γ

A. Saggio ELISA specifico per l'attività del gene PPAR γ su MSC differenziate in tessuto adiposo e trattate con HIV e gp120.

B. Analisi dell'espressione genica del PPAR γ su differenziamento adiposo delle MSC trattate con HIV e gp120.

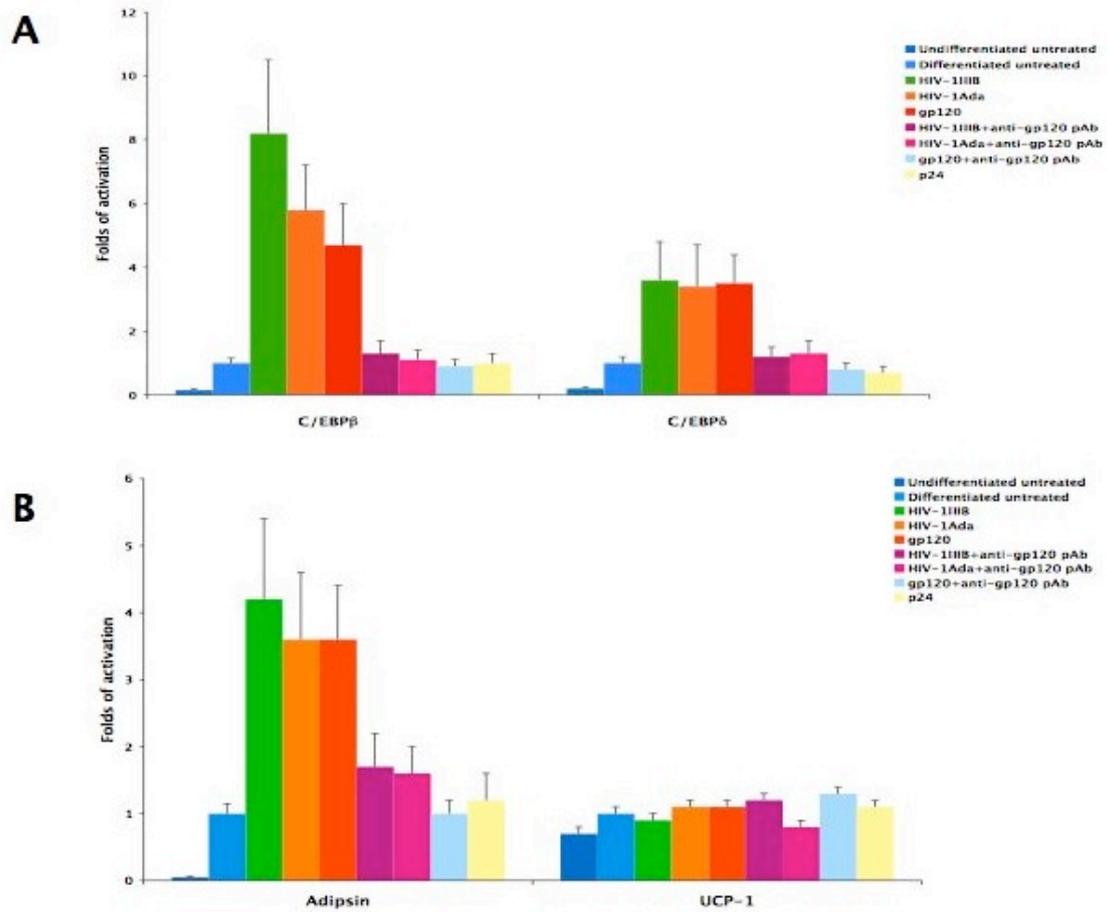


Figura 8 Analisi dell'espressione genica dei marcatori dell'adipogenesi

A. Analisi quantitativa degli RNA messaggeri di C/EBPβ e C/EBPδ.

B. Analisi quantitativa degli RNA messaggeri di adipsina e UCP-1.

6.6 La proteina Tat modula positivamente il differenziamento adipogenico delle MSC

Nel successivo set di esperimenti abbiamo cercato di studiare l'azione di Tat sul differenziamento delle MSC verso l'adipocita. La proteina ricombinante Tat è stata aggiunta alla concentrazione di 100ng/ml al momento della prima induzione del differenziamento adipogenico ed è stata aggiunta ad ogni cambio del terreno di coltura.

Abbiamo valutato l'entità del differenziamento osservando al microscopio le colture con *Oil Red O* dopo 10 giorni dall'inizio dell'induzione e del trattamento, constatando un consistente aumento dei vacuoli di lipidi nelle colture alle quali era stata aggiunta la proteina, rispetto al controllo non trattato ma differenziato (**Fig. 9**).

Per confermare questa osservazione, abbiamo analizzato l'espressione dei messaggeri di PPAR γ , C/EBP β e C/EBP δ attraverso saggi di *real time* RT-PCR sull'RNA totale estratto dalle cellule.

Tat ha indotto, al giorno 6, un aumento dell'mRNA di PPAR γ di 2.9 ± 0.5 volte ($P < 0.05$) rispetto ai controlli (**Fig. 10B**); mentre l'aumento degli mRNA di C/EBP β e C/EBP δ al giorno 3 è stato di 10.3 ± 2.5 volte ($P < 0.05$) e di 3.9 ± 1.1 volte ($P < 0.05$), rispettivamente (**Fig.11**).

Il prodotto del gene PPAR γ è regolato principalmente a livello post trascrizionale attraverso fosforilazione, per cui ne abbiamo valutato anche l'attività proteica, riscontrando un aumento di 3.9 ± 0.3 volte ($P < 0.05$) rispetto al controllo (**Fig. 10A**).

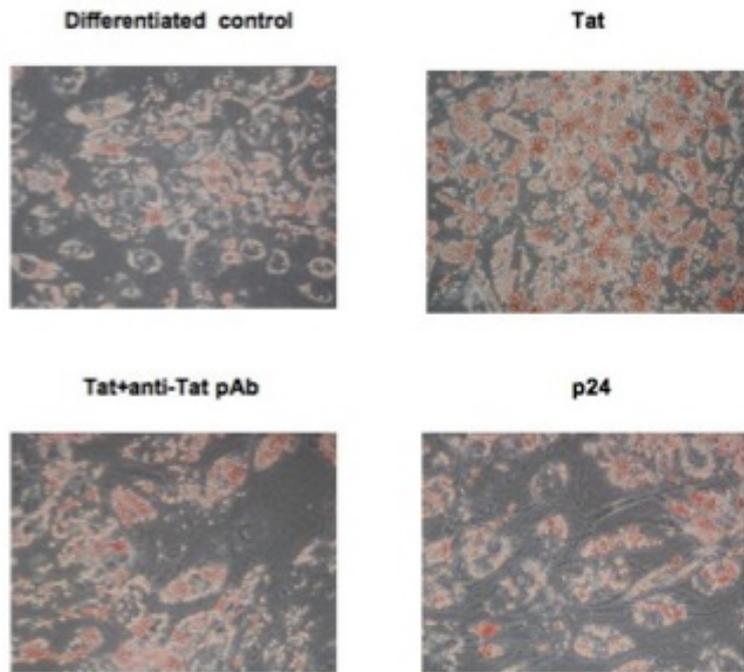


Figura 9 Tat induce un aumento dell'adipogenesi nelle MSC

Colture a confluenza di MSC differenziate in tessuto adiposo non trattate, trattate con Tat, con Tat pretrattato con anticorpo anti-Tat e con p24.

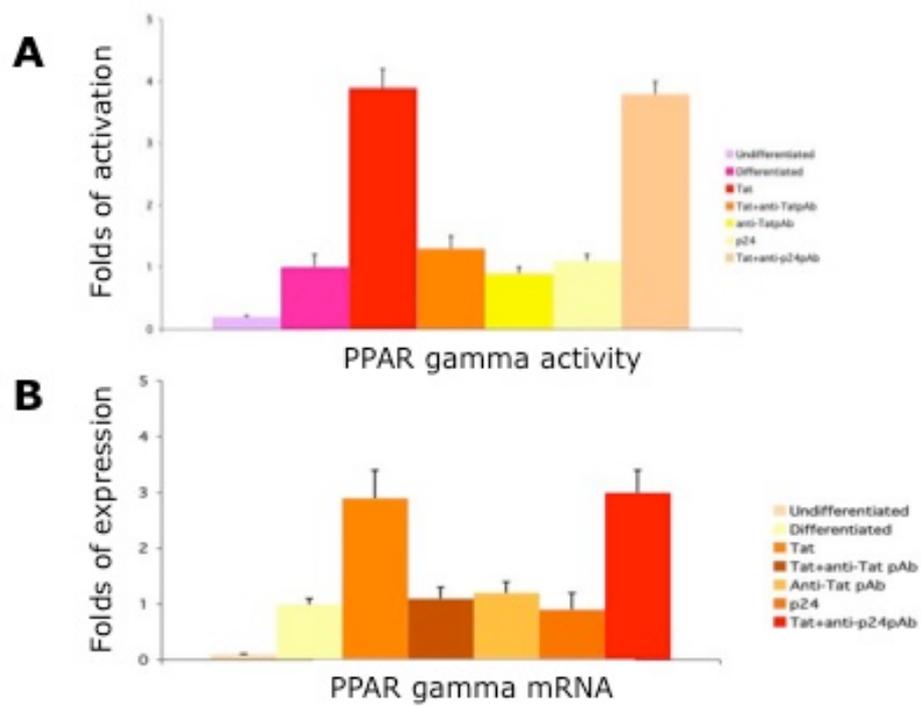


Figura 10 Espressione di PPAR γ in seguito al trattamento con Tat

A. Saggio ELISA sull'attività di PPAR γ .

B. Analisi di PCR quantitativa su PPAR γ .

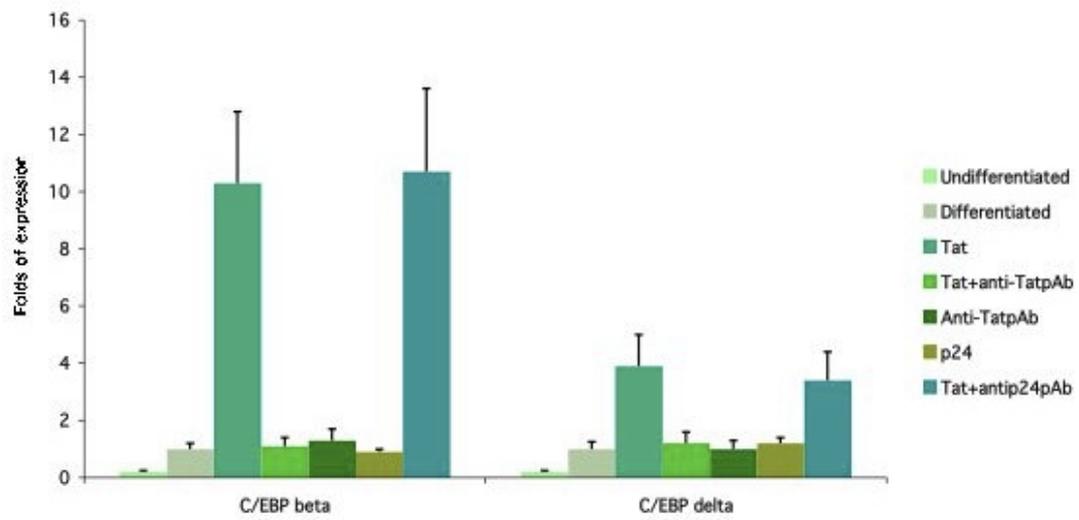


Figura 11 Analisi dell'espressione genica dell'adipogenesi

Analisi di PCR quantitativa di C/EBP β e C/EBP δ .

6.7 HIV-1 e la proteina gp120 inibiscono il differenziamento endoteliale delle MSC

Le MSCs possono essere differenziate verso le cellule endoteliali attraverso il trattamento con VEGF. Abbiamo cimentato con HIV-1 e gp120 le MSC trattate con VEGF e abbiamo analizzato l'espressione di marcatori specifici al fine di comprendere l'interazione col virus e con la proteina gp120 ricombinante. Attraverso analisi di citometria a flusso è stata analizzata l'espressione dei più importanti marcatori dell'endotelio a 7 giorni dall'induzione e dal trattamento: vWF, VEGFR-1 (FLT-1) e VEGFR-2 (KDR). I risultati mostrano una marcata diminuzione dell'espressione di tutte e tre le proteine in seguito al trattamento con il virus o con la glicoproteina (**Fig. 12**).

L'amplificazione quantitativa mediante *real time* RT-PCR ha fornito ulteriore conferma della diminuzione del livello di espressione di questi marcatori ($p < 0.05$) (**Fig. 13**).

Inoltre, il trattamento delle colture cellulari con anticorpi anti-gp120 non ha mostrato alcun effetto di rilevanza sull'espressione proteica dei marcatori endoteliali rispetto ai controlli.

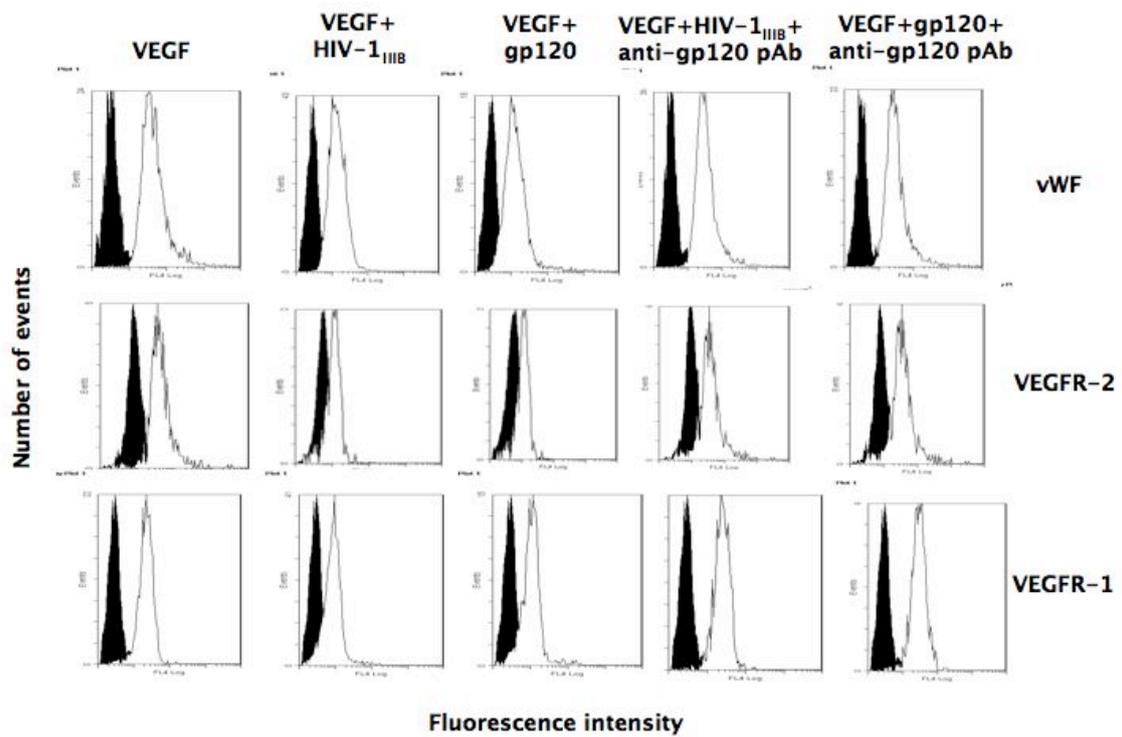


Figura 12 HIV e gp120 inibiscono il differenziamento endoteliale delle MSC
 Analisi in citometria a flusso di vWF, VEGFR-1 e VEGFR-2 in MSC differenziate in tessuto endoteliale non trattate, trattate con HIV-1_{III}, con gp120, con HIV pretrattato con anticorpo anti-gp120 e con gp120 pretrattata con anticorpo anti-gp120.

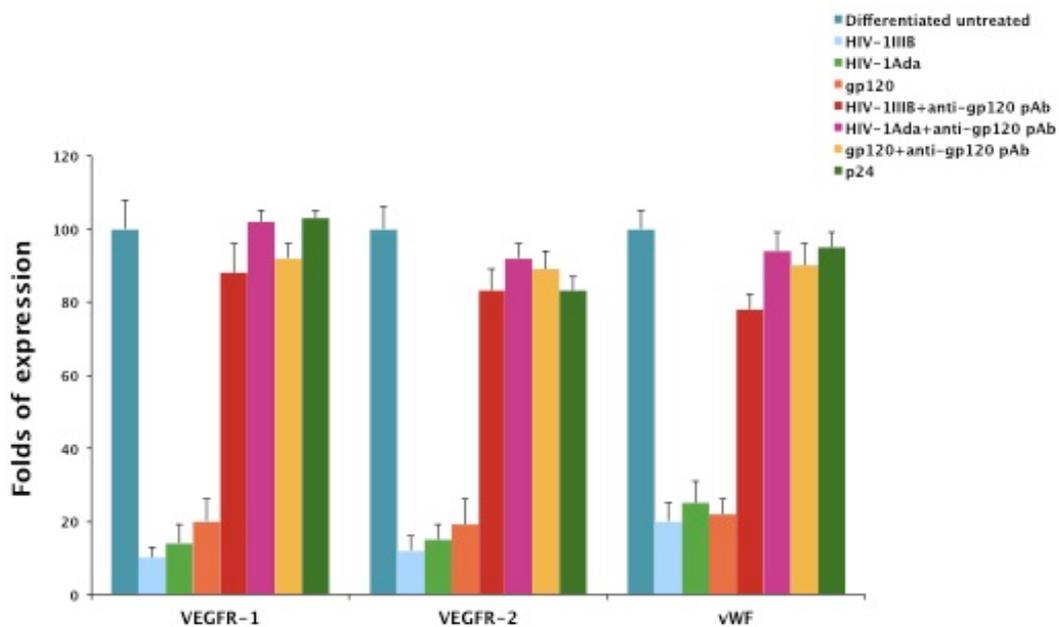


Figura 13 Inibizione dell'espressione genica dell'endoteligenesi

Analisi di PCR quantitativa degli RNA messaggeri di VEGFR-1, VEGFR-2 e vWF in MSC differenziate verso l'endotelio.

6.8 La proteina Tat inibisce il differenziamento endoteliale delle MSC

Abbiamo riproposto lo schema sperimentale precedente sulle MSC a confluenza trattate con VEGF e con 100ng/ml di Tat ricombinante per valutare l'effetto di Tat sul differenziamento endoteliale delle MSC. Le analisi di RT-PCR quantitativa indicano che Tat induce una importante inibizione dei messaggeri di vWF, VEGFR-1 e VEGFR-2 ($P < 0.05$) (**Fig. 14**).

Ulteriore prova deriva dai risultati in citometria a flusso, con i quali viene confermato un declino nei livelli di vWF intracellulare (**Fig. 15**), che vengono ripristinati bloccando Tat con un anticorpo policlonale neutralizzante.

E'interessante notare che anche in questo caso la concentrazione di Tat correla con l'entità dell'effetto che produce: aumentando la concentrazione della proteina, si osserva una maggiore inibizione dell'espressione del vWF (**Fig. 16**).

Al fine di cercare di elucidare i meccanismi che mediano questo effetto, abbiamo trattato le colture con diversi peptidi, parzialmente sovrapponibili, che corrispondono a distinti domini proteici di Tat.

I peptidi con i residui aminoacidici 61-80 e 74-86, che rappresentano il dominio RGD, regolano negativamente l'espressione del vWF.

Anche le sequenze relative al dominio basico (residui 41-60 e 51-70) e alla regione ricca in cisteine (residui 21-40) inducono un significativo decremento del vWF intracellulare, pur esercitando una inibizione minore rispetto a quella del dominio RGD. I rimanenti peptidi (residui 1-20 e 11-30) non inducono alcun effetto sull'espressione proteica, indicando che sono specifici domini di Tat a modulare l'alterazione del differenziamento endoteliale delle MSC (**Fig. 17**).

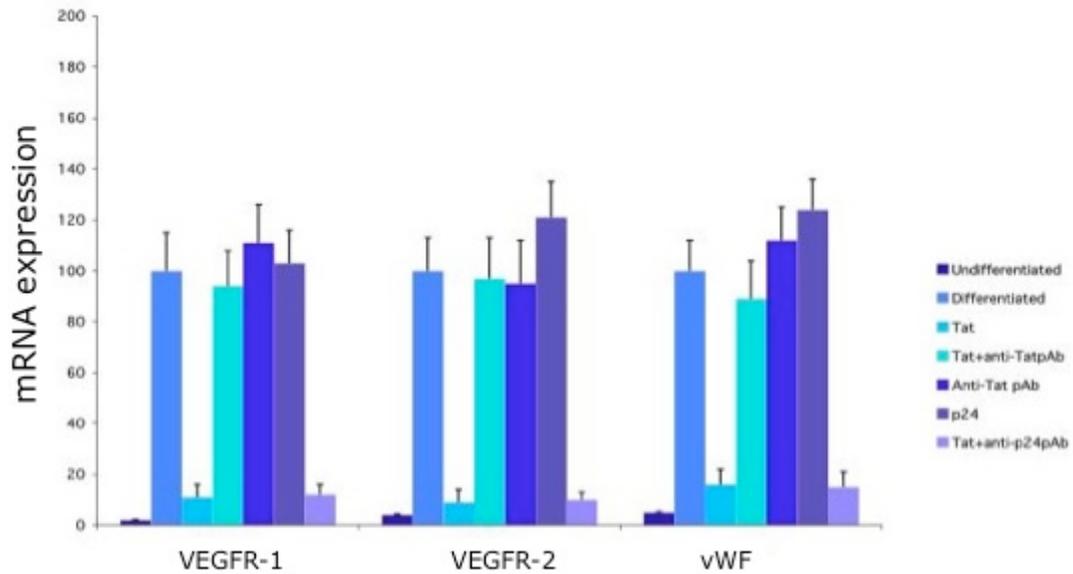


Figura 14 **Marcatori dell'endoteliogenesi in seguito a trattamento con Tat**
 Analisi di PCR quantitativa sui messaggeri di VEGFR-1, VEGFR-2 e vWF in MSC stimulate con VEGF e trattate con Tat.

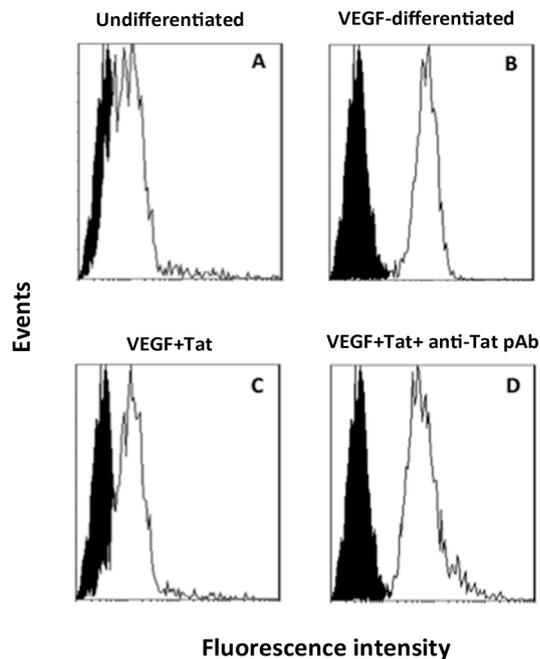


Figura 15 **Espressione intracellulare del vWF**

Analisi in citometria a flusso del vWF in MSC non differenziate (A), differenziate in tessuto endoteliale non trattate (B), trattate con Tat (C) e con Tat pretrattato con anticorpo anti-Tat (D).

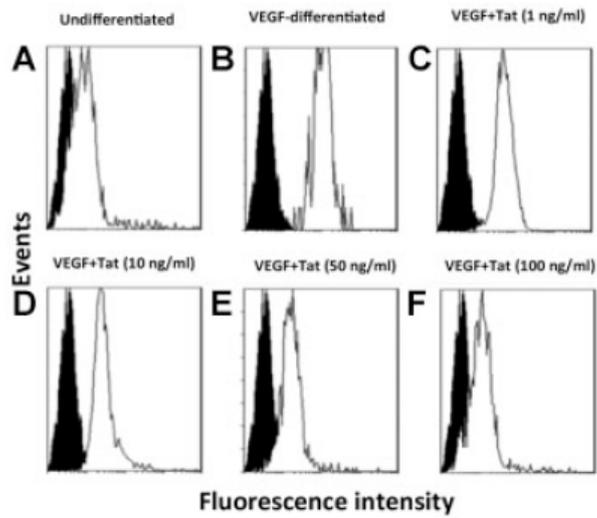


Figura 16 L'inibizione dell'endoteliogenesi correla con la concentrazione di Tat

Aumentando la concentrazione di Tat (C-F) nelle colture di MSC trattate con VEGF, diminuisce l'espressione del vWF.

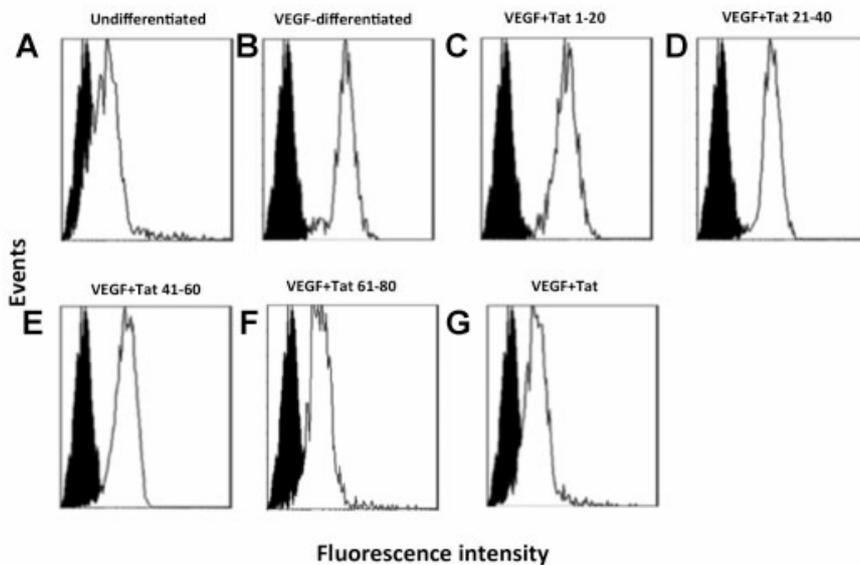


Figura 17 Specifici domini discreti nella sequenza di Tat inibiscono l'endoteliogenesi

I peptidi corrispondenti alla sequenza di Tat che specifica il dominio RGD per il riconoscimento delle integrine (F), riducono l'espressione del vWF.

I peptidi corrispondenti al dominio basico (E) e cisteinico (D) esercitano un'azione di blocco dell'endoteliogenesi minore rispetto al dominio RGD, mentre i peptidi del dominio N-terminale di Tat (C) non hanno effetto sul differenziamento.

6.9 I farmaci inibitori della proteasi virale inibiscono il differenziamento endoteliale

Abbiamo analizzato alcuni specifici farmaci antiretrovirali su colture cellulari di MSC indotte con VEGF per monitorare l'effetto sul differenziamento endoteliale.

Gli inibitori nucleosidici e nucleotidici della trascrittasi inversa (Tenofovir, Emtricitabina), il Maraviroc (inibitore dell'*entry* virale) e il Raltegravir (inibitore dell'integrasi) non inducono una sostanziale diminuzione dei livelli dell'espressione genica del vWF; gli inibitori non nucleosidi della trascrittasi inversa (Efavirenz, Nevirapina) mostrano un effetto lievemente più marcato.

Tuttavia, l'effetto più consistente e significativo ($p < 0.05$) sull'espressione dell'mRNA del vWF è causato dall'utilizzo degli inibitori della proteasi virale (Ritonavir, Saquinavir, Nelfinavir, Atazanavir, Darunavir) (**Fig. 18**).

I PI sono stati utilizzati in combinazione con il Ritonavir per ottenere una situazione simile alla pratica clinica, nella quale il Ritonavir è utilizzato per innalzare le concentrazioni plasmatiche degli altri PI.

Anche le analisi dei livelli di vWF intracellulare effettuate con la metodica della citometria a flusso confermano questi dati (**Fig. 19**).

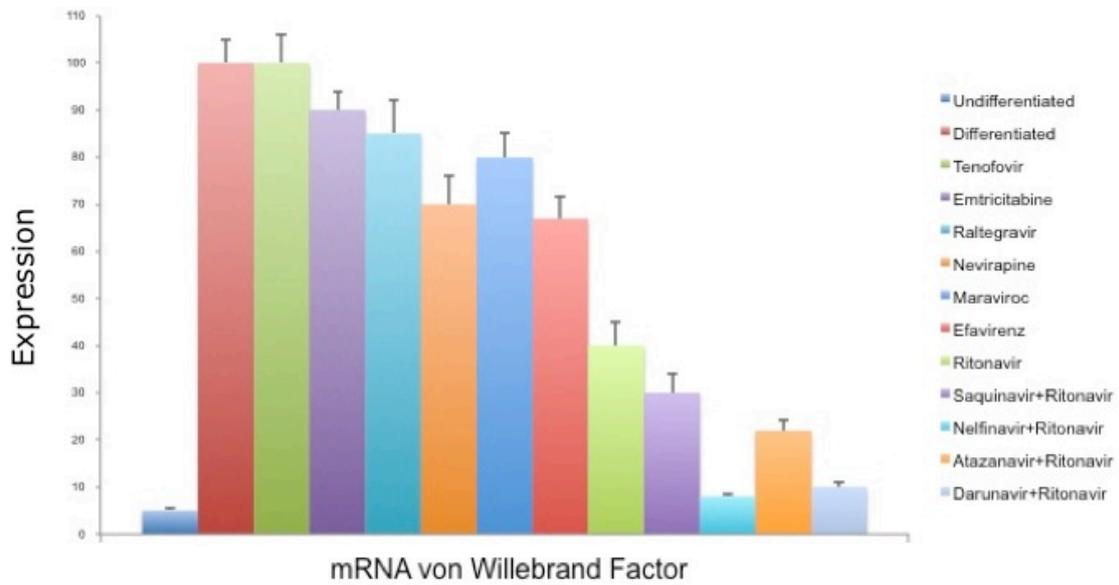


Figura 18 Espressione genica del vWF nelle MSC trattate con i farmaci antiretrovirali

Analisi di PCR quantitativa di MSC differenziate verso l'endotelio e trattate con farmaci antiretrovirali. Gli inibitori della proteasi virale abbattano i livelli di mRNA del vWF.

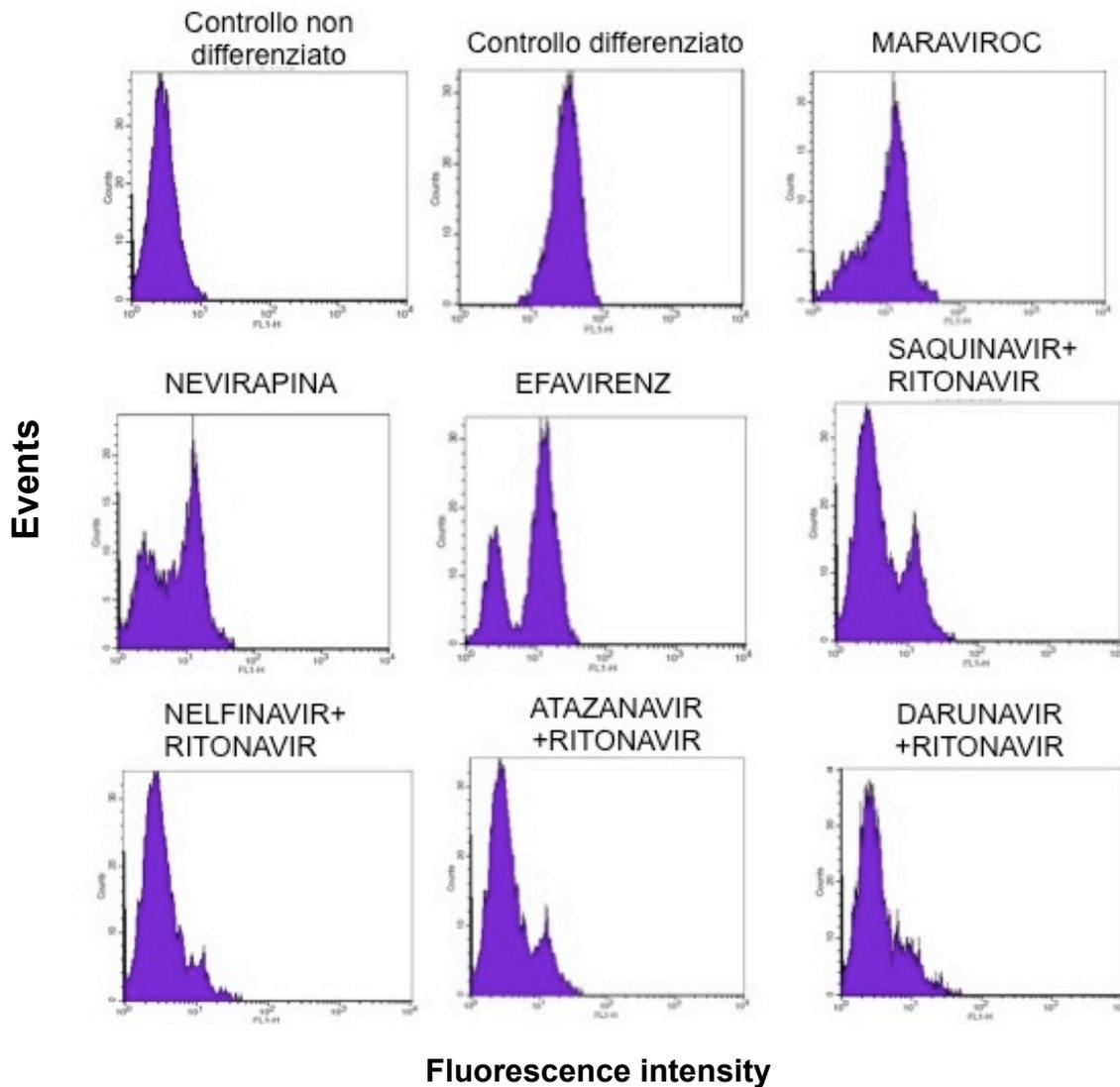


Figura 19 Espressione del vWF nelle MSC trattate con composti antiretrovirali

Il trattamento delle MSC differenziate in cellule endoteliali con i farmaci antiretrovirali causa lo spostamento dei livelli proteici del vWF verso i valori del controllo non differenziato, in particolare con l'uso degli inibitori della proteasi virale.

7. DISCUSSIONE

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) possiedono la capacità di poter differenziare in diverse filiere cellulari, tra le quali quella endoteliale, adiposa, muscolare liscia, condrogenica e quella osteogenica (**Pittenger et al., 1999**). Recenti studi nell'ambito della biologia vascolare hanno messo in luce la presenza di popolazioni di cellule staminali mesenchimali residenti nella tonaca intima e nella tonaca avventizia delle pareti dei vasi, dove svolgono una funzione di mantenimento dell'omeostasi e di rigenerazione della struttura endoteliale in caso di lesioni (**da Silva Meirelles et al., 2008**). Diversi studi hanno indicato una associazione tra lo sviluppo o l'accelerazione del processo aterosclerotico nei vasi dei pazienti HIV-positivi e il successivo incremento dell'incidenza di patologie cardiovascolari come l'infarto del miocardio (**Shrestha et al., 2014**). L'associazione tra infezione da HIV e disturbi cardiocircolatori è stata inoltre osservata durante il trattamento con specifici farmaci antiretrovirali, suggerendo uno scenario molto complesso nello sviluppo dei danni cardiovascolari, i cui meccanismi restano tuttora da chiarire (**Shrestha et al., 2014; Bozzette, 2011; Gibellini et al., 2012 a**).

Abbiamo quindi deciso di verificare l'esistenza di una possibile interazione tra HIV-1 e le MSC isolate da parete arteriosa, al fine di studiare gli effetti dell'infezione da HIV e dell'azione di alcune molecole antiretrovirali su queste cellule.

In primo luogo, le cellule da noi isolate dalle pareti vascolari sono state caratterizzate sia dal punto di vista genomico, sia da quello dei marcatori molecolari espressi in superficie.

Queste cellule vengono designate come MSC in base ad un complesso pannello di marcatori che non sono comunque esclusivi di questa linea; tuttavia le MSC non esprimono i tipici marcatori delle cellule della filiera ematopoietica, né quelli delle cellule endoteliali mature **(Covas et al., 2005; Ergün et al., 2007; Pasquinelli et al., 2007)**. Possono essere inserite tra le cellule staminali perchè presentano i trascritti dei geni ritenuti marker della staminalità, tra i quali Oct-2, Sox-4 e c-kit.

Abbiamo analizzato l'espressione del principale recettore virale, il CD4 e i due principali corecettori, CXCR4, che designa i ceppi linfocitotropici e CCR5, che designa i ceppi monocitotropici.

La molecola CD4, pur essendo espressa in termini di RNA messaggero, non è stata riscontrata in quantità rilevabili sulla superficie cellulare, ma è stata trovata all'interno delle cellule, per cui non si può escludere un particolare meccanismo di regolazione che ne permetta una limitata espressione superficiale **(Nacher et al., 2001)**.

In letteratura si annoverano diverse popolazioni cellulari sensibili all'infezione da HIV-1, tra le quali anche MSC isolate da midollo osseo, per le quali è stata osservata la presenza di messaggero del CD4 ma sulla cui superficie la molecola non era rilevabile **(Scadden et al., 1990; Nacher et al., 2001; Nottet et al., 1993)**.

Verificato che in teoria potevano essere suscettibili all'infezione virale, MSC non a confluenza sono state messe a contatto con il virus e, una volta isolato il DNA totale estratto dalle cellule, si è riscontrata la presenza del genoma virale retrotrascritto e integrato in quello cellulare. Eppure, saggi di replicazione virale hanno evidenziato il fatto che l'infezione delle MSC da parte di HIV-1 non è di tipo

produttivo, in quanto il livello dell'antigene virale p24 declina rapidamente dopo 7 giorni dal contatto tra virus e cellule.

Questo dato potrebbe suggerire che le MSC vadano a infoltire la già numerosa schiera di cellule che fungono da *reservoir* di HIV-1, ovvero una nicchia in cui il virus non replica in fase acuta ma resta latente e integrato nel DNA cellulare, sfuggendo perciò al controllo immunologico, pronto a riprendere il proprio ciclo vitale e a disseminare l'infezione.

Dal momento che esiste una popolazione di MSC localizzata proprio all'interno delle pareti vascolari, una volta riattivato il proprio ciclo, HIV-1 potrebbe rilasciare particelle infettanti direttamente nell'endotelio, esasperando il quadro di infiammazione che potrebbe essersi già instaurato.

Entrambi i ceppi virali, sia quello linfocitotropico (HIV-1_{IIIB}) che quello monocitotropico (HIV-1_{Ada}), inducono un forte aumento dell'apoptosi cellulare nelle colture di MSC non a confluenza.

Anche la proteina virale gp120 da sola induce un importante incremento della morte cellulare programmata, che viene soppressa invece attraverso il trattamento con il piridossal fosfato o con l'anticorpo contro gp120, suggerendo l'importanza dell'interazione tra gp120 e CD4 per l'attivazione dell'apoptosi **(Herbeuval e Shearer, 2006; Corbeil e Richman, 1995)**.

Al pari del virus e di gp120, la proteina Tat interferisce con la sopravvivenza cellulare. Tat è un prodotto virale già noto per la sua attività neurotossica e perché ne è stato dimostrato possibile l'accumulo in vari tessuti umani in seguito ad infezione da HIV-1.

Tat funziona sia come fattore autocrino nelle cellule infette, che tramite un circuito paracrino, quando viene secreta dalle cellule infette e va ad agire sulle cellule circostanti. Tat può produrre effetti, direttamente o indirettamente, in diversi organi e tessuti, come il rene, il miocardio e il sistema nervoso centrale **(Pugliese et al., 2005)**.

I nostri risultati indicano che Tat induce la morte cellulare in modo significativo solo a concentrazioni elevate (200-1000ng/ml), mentre a basse concentrazioni (1-10ng/ml) non altera l'entità dell'apoptosi in modo importante.

In letteratura è ben noto un duplice ruolo di Tat, che in certe linee cellulari e a concentrazioni nano/micromolari induce apoptosi, mentre in altre, a concentrazioni pico/nanomolari, protegge dalla morte cellulare programmata (**McCloskey et al., 1997; Barillari e Ensoli, 2002**).

Al fine di cercare una correlazione tra l'interazione HIV-MSK e i danni vascolari mediati dall'infezione virale, abbiamo spinto le cellule a differenziare prima verso il tessuto adiposo e poi verso quello endoteliale.

HIV, gp120 e Tat aumentano considerevolmente la spinta differenziativa verso il tessuto adiposo.

L'adipogenesi è regolata attraverso una sequenza di eventi molecolari e cellulari, che parte dall'arresto della proliferazione cellulare, come nella maggior parte dei differenziamenti cellulari: nel nostro caso il blocco replicativo è stato indotto dalla confluenza che produce inibizione da contatto.

Sotto appropriati stimoli si susseguono una o due espansioni clonali e successivamente vengono espressi il fattore di trascrizione PPAR γ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ*) e C/EBP α (*CCAAT/Enhancer Binding Protein α*).

Queste proteine inducono un ulteriore e permanente arresto della crescita cellulare e l'espressione completa del fenotipo differenziato.

Precocemente, vengono trascritti i geni C/EBP β e C/EBP δ , che inducono un aumento dei livelli di PPAR γ e di C/EBP α (**Rosen e Spiegelman, 2000**).

Nelle MSC isolate da pareti di vasi, il virus e le proteine virali gp120 e Tat in modo specifico sono in grado di indurre elevati livelli di PPAR γ ,

come dimostrano i livelli di messaggero e di proteina rilevati nei saggi da noi condotti. Anche i livelli degli mRNA di C/EBP β e C/EBP δ risultano incrementati, perciò l'interazione del virus con l'adipogenesi avviene durante i più precoci eventi molecolari che portano al differenziamento.

I nostri risultati sono in accordo con altri studi che hanno dimostrato che Tat incrementa l'adipogenesi di MSC isolate da midollo osseo attraverso l'inibizione di COUP-TF1, un repressore di PPAR γ (**Cotter et al., 2011**).

E' interessante come C/EBP β moduli l'espressione e la replicazione di HIV-1 nei monociti e nei macrofagi; è inoltre attivato dall'interazione tra gp120 e CD4 attraverso la via di segnalazione della MAP chinasi, suggerendo un più complesso ruolo di questo gene nella patogenesi di HIV (**Popik et al., 1998**). Inoltre, il blocco del CD4 riduce l'incremento adipogenico indotto da HIV (**Cotter et al., 2011**).

Quindi, probabilmente esistono diversi meccanismi attraverso i quali HIV-1 interagisce con i precursori endoteliali da noi studiati, alterandone il differenziamento adipogenico.

A differenza di quanto descritto finora, l'interazione con HIV, gp120 e Tat ostacola il differenziamento endoteliale, in quanto le MSC stimulate con il VEGF hanno mostrato livelli molto ridotti dei marcatori dell'endoteliogenesi, vWF, VEGFR-1 e VEGFR-2.

Questa osservazione potrebbe rappresentare un interessante meccanismo patogenetico di HIV-1.

La disfunzione endoteliale e la perdita di integrità delle strutture vascolari sono state ampiamente dimostrate nei pazienti HIV-positivi (**Mu et al., 2007; Crowe et al., 2010**).

L'aterosclerosi è stata descritta in arterie coronarie e cerebrali in seguito ad autopsia di individui HIV-infetti (**Paton et al., 1993**); studi retrospettivi hanno dimostrato un aumento dell'incidenza di

patologie cardiovascolari tre volte maggiore rispetto a soggetti sani **(Currier et al., 2003)**.

In particolare, diversi studi hanno descritto come l'infiammazione cronica, l'attivazione piastrinica e una eccessiva coagulazione portino alla perdita dell'omeostasi endoteliale e come questi eventi possano essere implicati nella correlazione tra l'infezione da HIV-1 e patologie cardiovascolari **(Mu et al., 2007; Lafeuilade et al., 1992; Toulon et al., 1993)**.

L'infiammazione cronica determina, soprattutto in cellule mononucleate, l'espressione di numerose citochine, quali IL-6, IL-8 e TNF α , che attivano le cellule endoteliali e l'adesione leucocitaria **(Buonaguro et al., 1992; Scala et al., 1994)**.

La proteina gp120, che a sua volta può stimolare l'attivazione di IL-6 e TNF α , determina un danno sia diretto che indiretto alle cellule endoteliali: è in grado di indurre apoptosi specialmente nel polmone, contribuendo in questo modo all'ipertensione polmonare **(Huang et al., 2001; Kanmogne et al., 2005)**.

Per quanto riguarda Tat, la sua interazione con il VEGF è stata oggetto di sperimentazione in diversi modelli cellulari, incluse cellule endoteliali e cellule derivate dal sarcoma di Kaposi. In questi modelli cellulari Tat, in sinergia con il fattore basico di crescita dei fibroblasti (bFGF) e con citochine infiammatorie, induce proliferazione, permeabilità vascolare e migrazione cellulare **(Barillari ed Ensoli, 2002; Urbinati et al., 2005)**, mentre non esercita questi effetti se viene aggiunta singolarmente alle colture cellulari **(Barillari et al., 1999)**.

Queste azioni sono mediate dal legame del dominio basico e della sequenza RGD di Tat con VEGFR-2 e le integrine $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$, rispettivamente, anche se vie di attivazione alternative non possono essere escluse **(Barillari ed Ensoli, 2002)**.

Per cercare di chiarire i meccanismi del blocco differenziativo esercitato da Tat, in alcune colture di MSC trattate con VEGF abbiamo

aggiunto singolarmente diverse sequenze della proteina, corrispondenti al dominio basico, a quello cisteinico e al dominio RGD. Questi peptidi inibiscono a diversi livelli l'espressione dei marcatori endoteliali.

La sequenza basica e quella ricca in cisteine rappresentano le regioni di Tat per il riconoscimento del VEGFR-2, mentre il dominio RGD lega le integrine $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$.

I meccanismi coinvolti nell'inibizione del differenziamento potrebbero essere correlati alla competizione tra Tat e VEGF per il legame al recettore VEGFR-2 e alle integrine **(Jia et al., 2001)**, oppure una eterodimerizzazione tra VEGF e Tat che riduce l'attività del VEGF stesso **(Barillari ed Ensoli, 2002)**.

Oltre a ciò, Tat può legare l'eparina, proprietà che potrebbe influire sull'interazione tra i proteoglicani dell'eparan solfato e VEGF, rendendo poco efficace il legame del VEGF al VEGFR-2 **(Rusnati et al., 1997)**. Altri report hanno dimostrato che Tat compete con la vitronectina per il legame all'integrina $\alpha_v\beta_3$, il quale gioca un importante ruolo per la completa attivazione del VEGF **(Barillari et al., 1993)**.

A differenti livelli, ognuno di questi meccanismi potrebbe essere coinvolto nell'inibizione del differenziamento endoteliale delle MSC.

L'evidenza che Tat possa direttamente minare l'integrità delle MSC nelle pareti vascolari può considerarsi un'altra modalità attraverso la quale HIV provoca lesioni vascolari e altera il tessuto adiposo: la perdita del controllo sul metabolismo del colesterolo determina uno squilibrio lipidico e lipodistrofia **(Brown, 2011)**.

Infine, abbiamo studiato l'effetto dei farmaci antiretrovirali sulle MSC, evidenziando come in particolare gli inibitori della proteasi virale (PI) inibiscano il differenziamento endoteliale.

Con l'invecchiamento della popolazione HIV-positiva, reso possibile grazie all'introduzione della HAART, le combinazioni dei fattori di

rischio cardiovascolare osservati nella popolazione generale in presenza di infezione da HIV-1 e della terapia, hanno posto e continuano a porre significative sfide terapeutiche.

In letteratura, la terapia HAART è stata associata a varie anomalie metaboliche, incluse la dislipidemia, l'insulino-resistenza, la lipoatrofia, la lipoipertrofia e l'obesità addominale, tutte condizioni che contribuiscono al rischio cardiovascolare. Una delle alterazioni più caratteristiche dei pazienti sotto regime terapeutico è la presenza di uno schema lipodistrofico, con perdita di tessuto adiposo sottocutaneo dal viso e dal tronco e un incremento del grasso addominale **(Anuurad et al., 2009)**.

Questa redistribuzione dell'adipe è la conseguenza di distinti ma paralleli cambiamenti riguardanti le vie metaboliche di lipidi, carboidrati e aminoacidi **(Carr et al., 1998 a)**.

Rispetto ai soggetti sani, i pazienti HIV-positivi sottoposti alla HAART, in particolare alla terapia con PI, mostrano elevati livelli di VLDL, decremento delle HDL, incremento dei trigliceridi e delle apolipoproteine B, C-III, E, H **(Anuurad et al., 2009)**. Uno dei principali motivi di queste alterazioni potrebbe essere l'omologia della regione della proteasi virale a cui si legano i PI con proteine coinvolte nel metabolismo lipidico **(Carr et al., 1998 b)**.

Per quel che concerne direttamente il danno endoteliale, sono stati riportati casi di premature lesioni alle carotidi tra i pazienti in terapia con PI, con una prevalenza molto maggiore rispetto a pazienti in terapia con altre classi di farmaci **(Maggi et al., 2000)**.

In uno studio osservazionale, il *French Hospital Database on HIV Study*, è stato riscontrato un aumento del rischio di infarto al miocardio di 2.5 volte in pazienti sottoposti a regime con PI **(Mary-Krause et al., 2003)**.

Shankar e Dube hanno individualmente descritto un indebolimento della vasodilatazione in uno studio di soggetti sani ai quali era stato

somministrato il PI Indinavir (**Shankar et al., 2005; Dube et al., 2008**).

Elevati livelli plasmatici della dimetilarginina (ADMA, *asymmetric dimethyl arginine*), un inibitore competitivo endogeno dell'ossido nitrico sintasi (enzima importante implicato nella vasodilatazione), sono stati correlati alla disfunzione endoteliale e ad importanti eventi cardiovascolari (**Boger, 2005**).

Studi recenti hanno suggerito che i livelli plasmatici di ADMA sono predittivi della formazione di lesioni vascolari e che l'aumento della sintesi e del rilascio di questa molecola da parte delle cellule endoteliali indicano una perdita di funzionalità (**Wu et al., 2009; Boger et al., 2000**).

Nello studio di Jiang e collaboratori, in topi con lesioni della carotide ai quali era stato somministrato l'indinavir, sono stati riscontrati livelli plasmatici di ADMA di tre volte superiori al normale (**Jiang et al., 2010**).

Ancora, nei pazienti in terapia HAART è stata osservata una peculiare tossicità mitocondriale, dovuta ad una drastica riduzione dell'enzima aconitasi (**Jiang et al., 2010**).

Ulteriormente, PI come Indinavir, Ritonavir e Atazanavir inducono stress ossidativo nel reticolo endoplasmatico dei macrofagi (**Zhou et al., 2005**).

Un altro importante componente dell'aterogenesi è rappresentato dall'iperplasia neointimale, il cui evento patologico scatenante è dato dalla proliferazione delle cellule muscolari (VSMC, *Vascular Smooth Muscle Cells*). Nella vascolatura sana, le VSMC possiedono un fenotipo contrattile non proliferante, in quanto l'endotelio ne impedisce la replicazione per mantenere l'omeostasi tissutale. In seguito a lesione dell'endotelio e dello strato muscolare, le VSMC sono direttamente esposte al torrente circolatorio, cosicchè sono indotte a migrare attraverso la lamina elastica intima e a proliferare,

dando origine all'iperplasia neointimale. L'endotelio danneggiato non è in grado di riparare le lesioni e di impedire l'iperplasia.

Lo studio di Jiang e collaboratori rivela come l'Indinavir promuova la formazione dell'iperplasia **(Jiang et al., 2010)**.

Altre sperimentazioni hanno osservato che i PI promuovono la proliferazione delle VSMC in co-coltura con cellule endoteliali **(Hebert et al., 2004)**.

I meccanismi alla base di questi eventi potrebbero includere la sovraespressione di fattori mitogeni prodotti dalle cellule endoteliali trattate con PI.

In aggiunta, gli antiretrovirali promuovono l'adesione piastrinica e la degranulazione in seguito a danno endoteliale, portando all'attivazione delle piastrine e al rilascio di PDGF, che a turno promuovono l'iperplasia neointimale **(Holme et al., 1998)**.

In conclusione, dal nostro studio sono emersi nuovi meccanismi patogenetici relativi al danno endoteliale direttamente causato da dall'infezione da HIV-1 e dalle proteine virali gp120 e Tat, che nel nostro modello cellulare, provocano un aumento della morte cellulare programmata delle MSC, ne ostacolano il differenziamento endoteliale e ne stimolano il differenziamento adipogenico **(Gibellini et al., 2011; Gibellini et al., 2012 b)**.

Inoltre, dal momento che in letteratura la disfunzione endoteliale e gli eventi cardiovascolari nei pazienti HIV-infetti sono stati imputati sia al virus che agli effetti della terapia, abbiamo testato gli effetti dei farmaci antiretrovirali e osservato che in particolare gli inibitori della proteasi impediscono alle MSC stimulate con VEGF, di differenziare in cellule endoteliali.

Queste considerazioni gettano una nuova luce sugli aspetti clinici dei pazienti HIV-positivi, che da una parte sono esposti al danno diretto del virus e dall'altra agli effetti dei farmaci, i quali sono certamente

una valida protezione contro la replicazione di HIV-1, ma sono anche responsabili dell'inasprimento dei danni vascolari dovuti al virus.

8. BIBLIOGRAFIA

- Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Developmental Biology* 2007; 7: 11
- Amarasinghe GK, De Guzman RN, Turner RB, Chancellor KJ, Wu ZR, Summers MF. NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-loop SL2 of the Ψ -RNA packaging signal. Implications for genome recognition. *Journal of Molecular Biology* 2000; 301: 491-511
- Ando M, Tsuchiya K, Nitta K. How to manage HIV-infected patients with chronic kidney disease in the HAART era. *Clinical and Experimental Nephrology* 2012; 16: 363-372
- Anuurad E, Semrad A, Berglund L. Human immunodeficiency virus and highly active antiretroviral therapy-associated metabolic disorders and risk factors for cardiovascular disease. *Metabolic Syndrome and related disorders* 2009; 7 (5): 401-410
- Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *Journal of Pathology* 2008; 214: 231-241
- Arend C, Brandmann M, Dringen R. The antiretroviral protease inhibitor Ritonavir accelerates glutathione export from cultured primary astrocytes. *Neurochemical Research* 2013; 38: 732-741
- Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012; 2: a007161
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbicher B, Schatterman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*

- 1997; 275: 964-967
- Baker JV, Lundgren JD. Cardiovascular implications from untreated human immunodeficiency virus infection. *European Heart Journal* 2011; 32: 945-951
 - Barillari G, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993; 90: 7941-7945
 - Barillari G, Sgadari C, Fiorelli V, Samaniego F, Colombini S, Manzari V, Modesti V, Nair BC, Cafaro A, Sturzl M, Ensoli B. The tat protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes vascular cell growth and locomotion by engaging the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins and by mobilizing sequestered basic fibroblast growth factor. *Blood* 1999; 663-672
 - Barillari G, Ensoli B. Angiogenic effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and its role in the pathogenesis of AIDS associated Kaposi's sarcoma. *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 15: 310-326
 - Berkowitz R, Fisher J, Goff SP. RNA packaging. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1996; 214: 177-218
 - Bedimo R, Maalouf NM, Zhang S, Drechsler H, Tebas P. Osteoporotic fracture risk associated with cumulative exposure to tenofovir and other antiretroviral agents. *AIDS* 2012; 26: 825-831
 - Betts MR, Krowka JF, Kepler TB, Davidian M, Christopherson C, Kwok S, Louie L, Eron J, Sheppard H, Frelinger JA. Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte activity is inversely correlated with HIV type 1 viral load in HIV type 1-infected Long-Term Survivors. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1999; 15 (13): 1219-1228

- Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, et al. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *Journal of Virology* 2001; 75: 11983-11991
- Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, Roederer M, Koup RA. Hiv nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 2006; 107 (12): 4781-4789
- Blanco J, Clotet B. Learning from drug changes in antiretroviral therapy. *AIDS* 2013; 27: 833-834
- Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Boger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circulation Research* 2000; 87: 99-105
- Boger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials. *Vascular Medicine* 2005; 10 (Suppl.1): S19-S25
- Bozzette SA. HIV and cardiovascular disease. *Clinical Infectious Diseases* 2011; 53: 92-93
- Brown TT. The effects of HIV-1 infection on endocrine organs. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2011; 25: 403-411
- Brown TT. HIV: an under-recognized secondary cause of osteoporosis? *Journal of Bone and Mineral Research* 2013; 28: 1256-1258
- Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L, Lewis P, Goldfarb D, Emerman M, Stevenson M. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that

- governs infection of non-dividing cells. *Nature* 1993; 365: 666-669
- Buonaguro L, Barillari G, Chang HK, Bohan CA, Kao V, Morgan R, Gallo RC, Ensoli B. Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *Journal of Virology* 1992; 66: 7159-7167
 - Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 2007; 11: 69-82
 - Canque B, Rosenzweig M, Gey A, Tartour E, Fridman WH, Gluckman JC. Macrophage inflammatory protein-1 α is induced by human immunodeficiency virus infection of monocyte-derived macrophages. *Blood* 1996; 87: 2011-2019
 - Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932-936
 - Carr A, Samaras K, Burton S, Law M, Freund J, Chisholm DJ, Cooper DA. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS* 1998 a; 12: F51-F58
 - Carr A, Samaras K, Chisholm DJ, Cooper DA. Pathogenesis of HIV-1 protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance. *The Lancet* 1998 b; 351: 1881-1883
 - Castronuovo D, Cacopardo B, Pinzone MR, Di Rosa M, Martellotta F, Schioppa O, Moreno S, Nunnari G. Bone disease in the setting of HIV infection: update and review of the literature. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2013; 17: 2413-2419
 - Chen H, Wei SQ, Engelman A. Multiple integrase functions are required to form the native structure of the human

- immunodeficiency virus type I intasome. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 17358-17364
- Corbeil J, Richman DD. Productive infection and subsequent interaction of CD4-gp120 at the cellular membrane is required for HIV-induced apoptosis of CD4⁺ T cells. *Journal of General Virology* 1995; 76: 681-690
 - Cotter EJ, Chew N, Powderly WG, Doran PP. HIV type 1 alters mesenchymal stem cell differentiation potential and cell phenotype ex-vivo. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2011; 27: 187-199
 - Covas DT, Piccinato CE, Orellana MD, Siufi JLC, Silva Jr. WA, Proto-Siqueira R, Rizzatti EG, Neder L, Silva ARL, Rocha V, Zago MA. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. *Experimental Cell Research* 2005; 309: 340-344
 - Covas DT, Siufi JLC, Silva ARL, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003; 36: 1179-1183
 - Crowe SM, Westhorpe CLV, Mekhamedova N, Jawororowsky A, Sviridov D, Burkinsky M. The macrophage: the intersection between HIV infection and atherosclerosis. *Journal of Leukocyte Biology* 2010; 87: 589-598
 - Currier JS, Taylor A, Boyd F, Dezii CM, Kawabata H, Burtcel B, Maa JF, Hodder S. Coronary heart disease in HIV-infected individuals. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome* 2003; 33: 506-512
 - Currier JS, Lundgren JD, Carr A, Klein D, Sabin CA, Sax PE, Schouten JT, Smieja M; Working Group 2. Epidemiological evidence for cardiovascular disease in HIV-infected patients and relationship to highly active antiretroviral therapy. *Circulation* 2008; 118 (2): e29-35

- da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008; 26: 2287-2299
- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science* 2006; 119: 2204-2213
- Dayton AI, Sodroski JG, Rosen CA, Goh WC, Haseltine WA. The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* 1986; 44: 941-947
- De Gemmis P, Lapucci C, Bertelli M, Tognetto A, Fanin E, Vettor R, Pagano C, Pandolfo M, Fabbri A. A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* 2006; 15: 719-726
- Déti EK, Thiébaud R, Bonnet F, Lawson-Ayayi S, Dupon M, Neau D, Pellegrin JL, Malvy D, Tchamgoué S, Dabis F, Morlat P. Prevalence and factors associated with renal impairment in HIV-infected patients, ANRS CO3 Aquitaine Cohort, France. *HIV Medicine* 2010; 11: 308-317
- Dimmeler S, Zeiher AM. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *Journal of Molecular Medicine* 2004; 82: 671-677
- Dube MP, Gorski JC, Shen C. Severe impairment of endothelial function with the HIV-1 protease inhibitor indinavir is not mediated by insulin resistance in healthy subjects. *Cardiovascular Toxicology* 2008; 8: 15-22
- Fakruddin JM, Laurence J. Interactions among human immunodeficiency virus (HIV)-1, interferongamma and receptor of activated NF-kappa B ligand (RANKL): implications for HIV pathogenesis. *Clinical and Experimental Immunology* 2004; 137: 538-545
- Ergün S, Tilki D, Hohn HP, Gehling U, Kilic N. Potential

- implications of vascular wall resident endothelial progenitor cells. *Thrombosis and Haemostasis* 2007; 98: 930-939
- Ergün S, Tilki D, Klein D. Vascular wall as a reservoir for different types of stem and progenitor cells. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011; 15 (4): 981-995
 - Farnet CM, Bushman FD. HIV cDNA integration: molecular biology and inhibitor development. *Aids* 1996; 10 (Suppl. A): S3-11
 - Fauci AS, Lane HC. Human immunodeficiency virus (HIV) disease: AIDS and related disorders in Harrison's Principle of internal medicine, 16th edition. McGraw Hill, 2005: 1076-1139
 - Fauci AS. Pathogenesis of HIV disease: opportunities for new prevention interventions. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 45 (Suppl. 4): S206-212
 - Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nature Medicine* 1995; 1: 129-134
 - Fisher AG, Feinberg MB, Josephs SF, Harper ME, Marselle LM, Reyes G, Gonda MA, Aldovini A; Debouk C, Gallo RC, Wong-Staal F. The *trans*-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* 1986; 320: 367-371
 - Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control. *American Society for Microbiology Press*, 2000
 - Forbes SJ, Vig P, Poulson R, Wright NA, Alison MR. Adult stem cell plasticity: new pathway of tissue regeneration become visible. *Clinical Science* 2002; 103: 355-369
 - Freed EO. HIV replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 2001; 26: 13-33
 - Freed EO. HIV-1 Gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 1998; 251:1-15

- Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, Roedersheimer MT, Van RN, Stenmark KR. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *American Journal of Pathology* 2006; 168: 659-669
- Gallay P, Hope T, Chin D, Trono D. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; 94: 9825-9830
- Gibellini D, Borderi M, De Crignis E, Cicola R, Vescini F, Caudarella R, Chiodo F, Re MC. RANKL/OPG/TRAIL plasma levels and bone mass loss evaluation in antiretroviral naïve HIV-1-positive men. *Journal of Medical Virology* 2007; 79: 1446-1454
- Gibellini D, De Crignis E, Ponti C, Cimatti L, Borderi M, Tschon M, Giardino R, Re MC. HIV-1 triggers apoptosis in primary osteoblasts and HOBIT cells through TNFalpha activation. *Journal of Medical Virology* 2008; 80: 1507-1514
- Gibellini D, Borderi M, De Crignis E, Clò A, Miserocchi A, Viale P, Re MC. Analysis of the effects of specific protease inhibitors on OPG/RANKL regulation in an osteoblast-like cell line. *New Microbiologica* 2010; 33 (2): 109-115
- Gibellini D, Alviano F, Miserocchi A, Tazzari PL, Ricci F, Clò A, Morini S, Borderi M, Viale P, Pasquinelli G, Pagliaro P, Bagnara GP, Re MC. HIV and recombinant gp120 affect the survival and differentiation of human vessel wall-derived mesenchymal stem cells. *Retrovirology* 2011; 8: 40
- Gibellini D, Borderi M, Clò A, Morini S, Miserocchi A, Bon I, Re MC. Antiretroviral molecules and cardiovascular diseases. *New Microbiologica* 2012 a; 35: 359-375
- Gibellini D, Miserocchi A, Tazzari PL, Ricci F, Clò A, Morini S, Ponti C, Pasquinelli G, Bon I, Pagliaro P, Borderi M, Re MC.

- Analysis of the effects of HIV-1 Tat protein on the survival and differentiation of vessel wall-derived human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2012 b; 113: 1132-1141
- Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. Elevated levels of CD38+CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. *The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study.*
 - Grewe B, Ueberla K. The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: ménage à trois during the early phase of the lentiviral replication cycle. *Journal of General Virology* 2010; 91: 1893-1897
 - Guha D, Ayyavoo V. Innate immune evasion strategies by human immunodeficiency virus type 1. *ISRN AIDS* 2013
 - Haij NB, Leghmari K, Planès R, Thieblemont N, Bahraoui E. HIV-1 Tat protein binds to TLR4-MD2 and signals to induce TNF- α and IL-10. *Retrovirology* 2013; 10: 123
 - Hartman TL, Buckheit Jr. RW. The continuing evolution of HIV-1 therapy: identification and development of novel antiretroviral agents targeting viral and cellular targets. *Molecular Biology International* 2012; 40:1965
 - Hebert VY, Crenshaw BL, Romanoff RL, Ekshyyan VP, Dugas TR. Effects of HIV drug combinations on endothelin-1 and vascular cell proliferation. *Cardiovascular Toxicology* 2004; 4: 117-131
 - Herbeuval JP, Shearer GM. Are blockers of gp120/CD4 interaction effective inhibitors of HIV-1 immunopathogenesis. *AIDS Reviews* 2006; 8 (1): 3-8
 - Holme PA, Muller F, Solum NO, Brosstad F, Froland SS, Aukrust P. Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection. *FASEB Journal* 1998; 12: 79-89

- Huang M, Orenstein JM, Martin MA, Freed EO. p6Gag is required for particle production from full length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *Journal of Virology* 1995; 69: 6810-6818
- Huang MB, Khan M, Garcia-Barrio M, Powell M, Bond VC. Apoptotic effects in primary human umbilical vein endothelial cell coltures caused by exposure to virion-associated and cell membrane-associated HIV-1 gp120. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome* 2001; 27: 213-221
- Hui L, Chen X, Haughey NJ, Geiger JD. Role of endolysosomes in HIV-1 Tat-induced neurotoxicity. *American Society for Neurochemistry* 2012; 4 (4): 243-252
- Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* 2005; 105 (7): 2783-2786
- Ivanchenko S, Godinez WJ, Lampe M, Kraeusslich HG, Eils R, Rohr K, Braeuchle C, Mueller B, Lamb DC. Dynamics of HIV-1 assembly and release. *Public Library of Science* 2009; 5: 1-12
- Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; 307: 58-62
Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes 1993; 6: 904-912
- Jia H, Lohr M, Jezequel S, Davis D, Shaikh S, Selwood D, Zachary I. Cysteine-rich and basic domain HIV-1 Tat peptides inhibit angiogenesis and induce endothelial cell apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 283: 469-479
- Jiang B, Khandelwal AR, Rogers LK, Hebert VY, Kleinedler JJ, Zavec JH, Shi W, Orr AW, Dugas TR. Antiretrovirals induce endothelial dysfunction via an oxidant-dependent pathway and

- promote neointimal hyperplasia. *Toxicological Sciences* 2010; 117 (2): 524-536
- Kanmogne GD, Primeaux C, Grammas P. Induction of apoptosis and endothelin-1 secretion in primary human lung endothelial cells by HIV-1 gp120 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 333: 1107-1115
 - Kasper DL, Fauci AS. Harrison's Infectious Diseases. McGraw Hill, 2010
 - Khurana R, Simons M. Endothelial progenitor cells: precursors for angiogenesis. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2003; 15 (3): 250-258
 - Krawczyk CS, Holmberg SD, Moorman AC, Gardner LI, McGwin Jr. G. Factors associated with chronic renal failure in HIV-infected ambulatory patients. *AIDS* 2004; 18: 2171-2178
 - Lafeuillade A, Alessi MC, Poizot-Martin I, Boyer-Neumann C, Zandotti C, Quilchini R, Aubert L, Tamalet C, Juhan-Vague I, Gastaut JA. Endothelial cell dysfunction in HIV infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome* 1992; 5: 127-131
 - La Placa M. Principi di microbiologia medica. Società Editrice Esculapio, tredicesima edizione 2012
 - Levy JA. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus infection. *Microbiological Reviews* 1993; 57 (1): 183-289
 - Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *Journal of Immunology* 2003; 170: 3369-3376
 - Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Guo YL, Lue TF, Lin CS. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells and Development* 2008; 17: 1053-1063
 - Liner II KJ, Ro MJ, Robertson KR. HIV, antiretroviral therapies, and the brain. *Current HIV/AIDS Reports* 2010; 7: 85-91
 - Maggi P, Serio G, Epifani G, Fiorentino G, Saracino A, Fico C,

- Perilli F, Lillo A, Ferraro S, Gargiulo M, Chirianni A, Angarano G, Regina G, Pastore G. Premature lesions of the carotid vessels in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors. *AIDS* 2000; 14: F123-F128
- Mansky LM, Temin HM. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *Journal of Virology* 1995; 69: 5087-5094
 - Mary-Krause M, Cotte L, Simon A, Partisani M, Costagliola D. Increased risk of myocardial infarction with duration of protease inhibitors therapy in HIV-infected men. *AIDS* 2003; 17: 2479-2486
 - McCloskey TW, Ott M, Tribble E, Khan SA, Teichberg S, Paul MO, Pahwa S, Verdin E, Chirmule N. Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells. *The Journal of Immunology* 1997; 158: 1014-1019
 - McComsey GA, Tebas P, Shane E, Yin MT, Overton ET, Huang JS, Aldrovandi GM, Cardoso SW, Santana JL, Brown TT. Bone disease in HIV infection: a practical review and recommendations for HIV care providers. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 51: 937-946
 - Mirambeau G, Lyonnais S, Gorelick RJ. Features, processing states and heterologous protein interactions in the modulation of the retroviral nucleocapsid protein function. *RNA Biology* 2010; 7: 1-11
 - Mu H, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C. Current update on HIV-associated vascular diseases and endothelial dysfunction. *World Journal of Surgery* 2007; 31: 632-643
 - Nacher M, Serrano S, Gonzales A, hernandez A, Marinoso ML, Vilella R, Hinarejos P, Diez A, Aubia J. Osteoblasts in HIV-infected patients: HIV-1 infection and cell function. *AIDS* 2001; 15: 2239-2243

- Nath A, Geiger J. Neurobiological aspects of human immunodeficiency virus infection: neurotoxic mechanisms. *Progress in Neurobiology* 1998; 54: 19-33
- Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN et al. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathogens* 2010; 6 (4)
- Nie Z, Bergeron D, Subramanian RA, Yao XJ, Rougeau N, Cohen EA. The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. *Journal of Virology* 1998; 72: 4104-4115
- Nottet H, Janse I, De Graaf L, Bakker LJ, Visser MR, Verhoef J. Infection of epithelial cell line Hep-2 with human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent. *Journal of Medical Virology* 1993; 40: 39-43
- O'Doherty U, Swiggard WJ, Jeyakumar D, McGain D, Malim MH. A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration. *Journal of Virology* 2002; 76: 10942-10500
- Orlandi A, Bennett M. Progenitor cell-derived smooth muscle cells in vascular disease. *Biochemical Pharmacology* 2010; 79:1706-1713
- Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immune deficiency virus infection. *New England Journal of Medicine* 1995; 332 (4): 209-216
- Pasquinelli G, Tazzari PL, Vaselli C, Foroni L, Buzzi M, Storci G, Alviano F, Ricci F, Bonafe M, Orrico C, Bagnara GP, Stella A, Conte R. Thoracic aortas from multiorgan donors are suitable for obtaining resident angiogenic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2007; 25: 1627-1634

- Pasquinelli G, Pacilli A, Alviano F, Foroni L, Ricci F, Valente S, Orrico C, Lanzoni G, Buzzi M, Tazzari P, Magliaro P, Stella A, Bagnara GP. Multidistrict human mesenchymal vascular cells: pluripotency and stemness characteristics. *Cytotherapy* 2010; 12: 275-287
- Pathak VK, Hu W-S. "Might as well jump!" Template switching by retroviral reverse transcriptase, defective genome formation, and recombination. *Seminars in Virology* 1997; 8: 141-150
- Paton P, Tabib A, Loire R, Tete R. Coronary artery lesions and human immunodeficiency virus infection. *Research in Virology* 1993; 144: 225-231
- Pereira LA, Bentley K, Peeters A, Churchill MJ, Deacon NJ. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acid Research* 2000; 28: 663-668
- Permanyer M, Ballana E, Esté JA. Endocytosis of HIV: anything goes. *Trends in Microbiology* 2010; 18 (12): 543-551
- Peterlin BM, Trono D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nature Reviews Immunology* 2003; 3: 97-107
- Piacentini L, Biasin M, Fenizia C, Clerici M. Genetic correlates of protection against HIV infection: the ally within. *Journal of Internal Medicine* 2008; 265: 110-124
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshalk DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147
- Pollard VW, Malim MH. The HIV-1 Rev protein. *Annual Review of Microbiology* 1998; 52: 491-532
- Popik W, Hesselgesser JE, Pitha PM. Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates MEK/ERK signaling pathway. *Journal of Virology* 1998;

72: 6406-6413

- Poropatich K, Sullivan Jr. DJ. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *Journal of General Virology* 2011; 92: 247-68
- Price JC, Thio CL. Liver disease in the HIV-infected individual. *Clinical Gastroenterology and hepatology* 2010; 8: 1002-1012
- Psaltis PJ, Harbuzariu A, Delacroix S, Holroyd EW, Simari RD. Resident vascular progenitor cells – diverse origins, phenotype and function. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 2011; 4 (2): 161-176
- Pugliese A, Vidotto V, Beltramo T, Petrini S, Torre D. A review of HIV-1 Tat protein biological effects. *Cell Biochemistry and Function* 2005; 23: 223-227
- Puoti M, Moioli MC, Travi G, Rossotti R. The burden of liver disease in human immunodeficiency virus-infected patients. *Seminars in Liver Disease* 2012; 32: 103-113
- Purcell DF, Martin MA. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *Journal of Virology* 1993; 67: 6365-6378
- Rein A, Henderson LE, Levin JG. Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends in Biochemical Sciences* 1998; 23: 297-301
- Rieckmann P, Poli G, Fox CH, Kehrl JH, Fauci AS. Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alpha production and Ig secretion in B lymphocytes from HIV-infected individuals but not from seronegative donors. *Journal of Immunology* 1991; 147: 2922-2927
- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*

- 2003; 21: 105-110
- Romerio F, Gabriel MN, Margolis D. Repression of human immunodeficiency virus type 1 through the novel cooperation of human factors YY1 and LSF. *Journal of Virology* 1997; 71: 9375-9382
 - Rosen E, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2000; 16: 145-171
 - Ross EK, Buckler-White AJ, Rabson AB, Enguld G, Martin MA. Contribution of NF-kB and Sp1 binding motifs to the replicative capacity of human immunodeficiency virus type 1: distinct patterns of viral growth are determined by T-cell types. *Journal of Virology* 1991; 65: 4350-4358
 - Rusnati M, Coltrini D, Oreste P, Zoppetti G, Albin A, Noonan D, d'Adda di Fagagna F, Giacca M, Presta M. Interaction of HIV-1 Tat with heparin. Role of the backbone structure, sulfation and size. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 11313-11320
 - Scadden DT, Zeira M, Woon A, Wang Z, Schieve L, Ikeuchi K, Lim B, Groopman JE. Human immunodeficiency virus infection of human bone marrow stromal fibroblasts. *Blood* 1990; 76: 317-322
 - Scala G, Ruocco MR, Ambrosino C, Mallardo M, Giordano V, Baldassare F, Dragonetti E, Quinto I, Venuta S. The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 Tat protein. *Journal of Experimental Medicine* 1994; 179: 961-971
 - Scarlata S, Carter C. Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1614: 62-72
 - Scheubel RJ, Zorn H, Silber RE, Kuss O, Morawietz H, Holtz J, Simm A. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass

- grafting. *Journal of the American College of Cardiology* 2003; 42: 2073-2080
- Shankar SS, Dube MP, Gorski JC, Klaunig JE, Steinberg HO. Indinavir impairs endothelial function in healthy HIV-negative men. *American Heart Journal* 2005; 150: 933
 - Shrestha S, Irvin MR, Grunfeld C, Arnett DK. HIV, inflammation and calcium in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology* 2014; 34 DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.302191
 - Siliciano JD, Siliciano RF. Latency and viral persistence in HIV-1 infection. *The Journal of Clinical Investigation* 2000; 106: 823-825
 - Smith SM. The pathogenesis of HIV infection: stupid may not be so dumb after all. *Retrovirology* 2006; 3: 60
 - Svarovskaia ES, Cheslock SR, Zhang WH, Hu WS, Pathak VK. Retroviral mutation rates and reverse transcriptase fidelity. *Frontiers in Bioscience* 2003; 8: 117-134
 - Swanstrom R, Wills JW. Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. In: Coffin H, Varmus HE, eds. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997: 263-334
 - Swingler S, Mann A, Jacque J, Brichacek B, Sasseville VG, Williams K, et al. HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nature Medicine* 1999; 5: 997-1003
 - Tebas P, Powderly WG, Claxton S, Marin D, Tantisiriwat W, Teitelbaum SL, Yarasheski KE. Accelerated bone mineral loss in HIV-infected patients receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2000; 14: F63-F67
 - Temin HM. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993; 90: 6900-6903

- Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Bostrom K, Demer LL. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* 2003; 108: 2505-2510
- Torsney E, Qingbo X. Resident vascular progenitor cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2011; 50: 304-311
- Toulon P, Lamine M, Ledjev I, Guez T, Holleman ME, Sereni D, Sicard D. A heparin cofactor II deficiency in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Thrombosis and Haemostasis* 1993; 70: 730-735
- Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology* 1999; 285: 1-32
- Ugolini S, Mondor I, Sattentau QJ. HIV-1 attachment: another look. *Trends in Microbiology* 1999; 7: 144-149
- Urbinati C, Mitola S, Tanghetti E, Kumar C, Waltenberger J, Ribatti D, Presta M, Rusnati M. Integrin alphavbeta3 as a target for blocking HIV-1 Tat-induced endothelial cell activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2005; 25: 2315-2320
- Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 1998; 92: 451-462
- Wei SQ, Mizuuchi K, Craigie R. A large nucleoprotein assembly at the ends of the viral DNA mediates retroviral DNA integration. *European Molecular Biological Organization Journal* 1997; 16:7511-7520
- Weiss L, Haeffner-Cavaillon N, Laude M, Gilquin J, Kazatchkine MD. HIV infection is associated with the spontaneous production of interleukin-1 (IL-1) in vivo and with an abnormal release of IL-1 α in vitro. *AIDS* 1989; 3: 695-699
- Wright EJ. Neurological disease: the effects of HIV and antiretroviral therapy and the implications for early

- antiretroviral therapy initiation. *Current opinion in HIV and AIDS* 2009; 4: 447-452
- Wu CC, Wen SC, Yang CW, Pu SY, Tsai KC, Chen JW. Plasma ADMA predicts restenosis of arteriovenous fistula. *Journal of the American Society of Nephrology* 2009; 20: 213-222
 - Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichenspurner H, Kilic N, Ergün S. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development and Disease* 2006; 133: 1543-1551
 - Zhou W, Resh MD. Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *Journal of Virology* 1996; 70: 8540-8548
 - Zhou H, Pandak Jr. WM, Lyall V, Natarajan R, Hylemon PB. HIV protease inhibitors activate the unfolded protein response in macrophages: implication for atherosclerosis and cardiovascular disease. *Molecular Pharmacology* 2005; 68: 690-700