

Università degli Studi di Bologna

**Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e
Sperimentale**

**Sezione di Microbiologia
Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Mediche XVII ciclo**

Settore scientifico-disciplinare MED/07: Microbiologia e Microbiologia Clinica

TESI DI DOTTORATO

Tecniche di biologia molecolare per la determinazione quantitativa di HIV-DNA
(integrato ed episomale) in soggetti HIV-1 infetti

Presentata da:

Dott.ssa FRANCESCA VITONE

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. MARIALUISA ZERBINI

Relatore:

Chiar.mo Prof. MARIA CARLA RE

2003-2006

INDICE

1.0 INTRODUZIONE	pag. 5
2.0 Storia dell'AIDS	pag. 8
3.0 Struttura del virione	pag 11
4.0 Il genoma di HIV	pag 14
5.0 Proteine strutturali di HIV-1	pag 17
5.1 Poliproteina Pol	pag 19
5.2 Poliproteina Env	pag 22
5.3 Poliproteina Gag	pag 24
5.4 Proteine regolatrici e accessorie di HIV	pag 26
6.0 Ciclo replicativo di HIV	pag 30
6.1 Adesione e fusione	pag 31
6.2 Retrotrascrizione	pag 32
6.3 Integrazione	pag 34
6.4 Trascrizione	pag 35
6.5 Assemblaggio	pag 36
6.6 Maturazione e gemmazione	pag 36
7.0 Variabilità genetica	pag 38
8.0 Modalità di trasmissione di HIV	pag 40
8.1 Rischio di infezione a seguito di inseminazione artificiale o da trapianto di organi/tessuti	pag 41
9.0 Patogenesi dell'AIDS	pag 43
9.1 Infezione acuta o primaria	pag 44
9.2 Latenza clinica	pag 45
9.3 Fase sintomatica o di AIDS conclamato	pag 46
10.0 La diagnosi d'infezione da HIV	pag 48
10.1 Il test di avidità	pag 52
11.0 La terapia farmacologia	pag 54
11.1 Il fallimento terapeutico	pag 57
11.2 La farmaco resistenza	pag 58
12.0 Il follow-up del paziente infetto	pag 61
12.1 La carica virale	pag 62
12.2 Quantificazione del DNA provirale	pag 66

13.0 I <i>reservoir</i> di HIV	pag 67
13.1 I <i>reservoir</i> nell'infezione primaria	pag 70
13.2 I <i>reservoir</i> nell'infezione cronica	pag 71
13.3 Implicazioni cliniche del ruolo dei <i>reservoir</i>	pag 71
PARTE SPERIMENTALE	
14.0 <i>Obiettivo della ricerca</i>	pag 73
14.1 Trapianto epatico nei soggetti con infezione da HIV	pag 77
15.0 <i>Materiali e Metodi</i>	pag 79
15.1 Il sistema Light CYCLER	pag 81
15.2 Determinazione quantitativa di DNA totale di HIV-1 nei linfomonociti	pag 82
15.3 Determinazione quantitativa del DNA episomiale di HIV-1 nei linfomonociti	pag 85
16.0 <i>Risultati</i>	pag 88
17.0 <i>Discussione</i>	pag 92
BIBLIOGRAFIA	pag 97

PARTE GENERALE

1.0 INTRODUZIONE

Il virus dell'immunodeficienza acquisita di tipo 1 (HIV-1) è stato identificato come agente etiologico della sindrome dell'immunodeficienza acquisita (AIDS) nel 1983.

Dati epidemiologici recenti (*annual AIDS epidemic update 2005*) stimano che nel mondo ci siano circa 40 milioni di contagiati e tra questi 4,2 milioni sono i nuovi casi individuati nel 2005, mentre i decessi registrati sono circa 3 milioni di cui 570 000 sono bambini.

Il virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV) è classificato nella famiglia dei *Retroviridae*, che comprende virus a genoma diploide costituito da RNA a singolo filamento a polarità positiva, che durante il ciclo replicativo è convertito a doppio filamento di DNA lineare, successivamente integrato nel genoma dell'ospite. I Retrovirus sono stati isolati nella maggior parte dei vertebrati e associati a molti tipi di patologie che spaziano da forme tumorali, alterazioni del sistema immunitario e forme neurologiche di tipo degenerativo. Il loro peculiare ciclo replicativo, l'associazione con importanti patologie e il complesso rapporto virus-ospite hanno destato un continuo interesse scientifico tanto che i *Retroviridae* rappresentano una delle famiglie virali in assoluto più studiate, almeno negli ultimi 30 anni. I retrovirus presentano un genoma a RNA diploide a polarità positiva e sono caratterizzati da un peculiare ciclo replicativo, che prevede un intermedio a DNA.

La famiglia dei retrovirus comprende due sottofamiglie (*Orthoretrovirinae* e *Spumaretrovirinae*) e sette generi (in base a similitudini delle sequenze aminoacidiche a livello delle proteine della trascrittasi inversa), cinque dei quali sono stati correlati all'insorgenza di tumori nell'animale e almeno in un caso (*deltaretrovirus*) nell'uomo (Tabella 1). Nella sottofamiglia degli *Orthoretrovirinae*, gli **Alfaretrovirus**, il cui prototipo è rappresentato dal virus del sarcoma di Rous¹ comprendono anche altri virus in grado di causare tumori negli uccelli quali, per esempio, il virus della leucemia aviaria (*Avian leukosis virus*) e il virus del sarcoma aviario (*Avian sarcoma virus*); i

¹ A Peyton Rous (1911) si devono le prime ricerche sui virus oncogeni. L'associazione virus-tumore nasce all'inizio del XX secolo proprio con la storia dei retrovirus e in particolare con la scoperta del sarcoma di Rous, allora approssimativamente definito come un agente non filtrabile in grado di provocare un tumore solido nel pollo. Dal momento della sua scoperta al momento in cui veniva capito il meccanismo di trascrizione di questi virus devono passare alcuni anni, e solo nel 1970 veniva identificata, grazie agli studi di Baltimore e Temin (Premio Nobel 1975), la trascrittasi inversa, enzima che darà il nome all'intera famiglia.

Betaretrovirus e i **Gammaretrovirus** sono rispettivamente causa di tumori mammari nel topo come il virus del tumore mammario del topo (*Mouse mammary tumor virus*) e di sarcomi nel gatto come il virus del sarcoma felino (*Murine leukemia virus*). I **Deltaretrovirus** comprendono il virus della leucemia bovina (*bovine leukaemia virus*) e i virus linfotropici dei primati (PTLV 1 e 2), quali i virus della leucemia della scimmia 1 e 2 (*Simian T lymphotropic virus type 1/2*) e il virus della leucemia umana a cellule T di tipo 1 e 2 (HTLV: *Human T-lymphotropic virus type 1/2*) mentre al genere **Epsilonretrovirus** appartiene il virus del sarcoma dermico di Walleye, di esclusivo interesse veterinario. Al genere **Lentivirus** in grado di causare disordini di tipo degenerativo a carico del sistema immunitario e nervoso, caratterizzati da una progressione molto lenta, appartengono virus in grado di causare patologie nell'animale [per esempio FIV (virus dell'immunodeficienza del gatto) o SIV (virus della immunodeficienza della scimmia) e nell'uomo (HIV-1 e 2: virus dell'Immunodeficienza umana di tipo 1 e 2)]. Nella sottofamiglia dei Spumaretrovirinae si osserva solo un genere, rappresentato dal genere **Spumavirus**, a cui appartiene il virus schiumoso dello scimpanzé, di cui è ignoto il ruolo patogeno ma che possiede la caratteristica culturale, da cui deriva il nome della classificazione tassonomica, di determinare una caratteristica citopatologia "schiumosa" osservabile *in vitro*.

HIV appartiene al genere Lentivirus, che comprende virus che instaurano un'infezione persistente e determinano malattie cronico degenerative a lenta progressione. Sono noti due tipi strettamente correlati di HIV detti HIV-1 e HIV-2 che, sebbene mostrino differenze nella loro struttura genomica e nell'antigenicità, danno origine a sindromi clinicamente simili. HIV-1 è la più diffusa causa di AIDS in Europa e negli USA, mentre HIV-2, meno virulento, è diffuso per lo più in Africa Occidentale, Caraibi e Sud America. La trasmissione del virus avviene attraverso il rapporto sessuale, il contatto con sangue o emoderivati infetti o per contagio tra madre HIV positiva e feto^[2].

Dopo un lungo periodo di incubazione asintomatica si instaura l'immunodeficienza causata dal virus e dovuta alla progressiva deplezione dei linfociti T helper CD4+, bersaglio preferenziale di HIV. Negli stadi più avanzati della malattia si sovrappongono poi infezioni opportuniste, normalmente controllate dalla risposta immunitaria. Tali infezioni possono essere veicolate da batteri, funghi, protozoi o virus e generalmente sono la causa del decesso del paziente.

Tabella 1. Famiglia Retrovirus

Sottofamiglia Orthoretrovirinae	
Genere Alpharetrovirus	Virus del Sarcoma di Rous, Virus della leucemia aviaria, Virus del sarcoma aviario
Genere Betaretrovirus	Virus del tumore mammario del topo, virus Mason- Pfizer
Genere Gammaretrovirus	Virus della leucemia murina, Virus della leucemia felina
Genere Deltaretrovirus	Virus della leucemia bovina, STLV-1/2, HTLV-1/2
Genere Epsilonretrovirus	Virus del sarcoma dermico di Walley
Genere Lentivirus	Virus dell'immunodeficienza bovina, Virus dell'immunodeficienza felina, Virus dell'immunodeficienza del cavallo, Virus dell'immunodeficienza dell'ovino e i lentivirus dei primati quali il Virus dell'immunodeficienza della scimmia SIV-1/2 e dell'uomo HIV-1/2
Sottofamiglia Spumaretrovirus	
Genere Spumavirus	Virus schiumoso della scimmia, Virus schiumoso del felino

2.0 STORIA DELL'AIDS

L'AIDS (o *Acquired ImmunoDeficiency Sindrome*) è stato riportato per la prima volta in letteratura nel **1981**, anche se per alcuni studiosi qualche caso isolato si era già verificato negli USA e in altre zone del mondo (Haiti, Africa, Europa) nel corso degli anni '70.

Sul finire del **1980** un ricercatore dell'Università della California, Michael Gottlieb, svolge uno studio sul sistema immunitario e scopre un giovane paziente che soffre di un raro tipo di polmonite causata da *Pneumocystis carinii* (un microrganismo a metà strada tra protozoi e miceti, sino a quell'epoca noto per la capacità di causare la malattia solo in individui affetti da una grave compromissione del sistema immunitario, come i nati prematuri o i soggetti con deficit genetici della risposta immune). Successivamente Gottlieb scopre altri tre casi, tutti con un basso livello di linfociti T, in pazienti che hanno una caratteristica in comune: l'omosessualità.

Così, nel **Giugno 1981** il CDC (Center for Disease Control and Prevention) di Atlanta, segnala un improvviso aumento di casi di polmonite da *Pneumocystis carinii*; la nuova patologia è definita "*gay pneumonia*" o "polmonite dei gay". Si vede che le alterazioni del sistema immunitario proprie di questi pazienti non sono dovute a cause genetiche, ma sono state acquisite in un secondo momento, per cause esterne ancora sconosciute. Si scopre inoltre che questa forma di polmonite coinvolge anche tossicodipendenti e soggetti sottoposti a trasfusione di sangue a somministrazione di emoderivati, e che talvolta vi è comparsa di infezioni o manifestazioni tumorali (come il sarcoma di Kaposi).

Nel **Luglio 1982** a questo insieme di patologie è assegnato il nome di AIDS (*Acquired ImmunoDeficiency Sindrome* o "Sindrome da Immunodeficienza Acquisita"). Dopo la dimostrazione della possibilità di trasmissione materno-fetale della malattia, si ipotizza che all'origine di tutto potrebbe esserci un agente infettante (un virus), capace di trasmettersi soprattutto per via ematica (durante i rapporti sessuali, attraverso trasfusioni di sangue, per via diaplacentare dalla madre al feto, etc.), e in grado di colpire selettivamente le cellule del sistema immunitario.

Nel **Maggio 1983** il francese Luc Montagnier e lo statunitense Robert Gallo identificano il Retrovirus responsabile dell'AIDS, inizialmente denominato HTLV-III (*Human-Lymphocytotropic Virus tipo 3*) per la sua somiglianza con HTLV-I, virus responsabile di alcune forme di leucemia; in seguito si scopre che il nuovo agente infettivo ha

caratteristiche biologiche particolari, per cui viene chiamato HIV (Human Immunodeficiency Virus), di cui oggi si conoscono due tipi, HIV-1 ed HIV-2 (il primo è quello più diffuso e di maggiore patogenicità).

Nel **1985** entrano in commercio i primi reagenti diagnostici per la ricerca degli anticorpi contro il virus e l'accertamento delle infezioni, ed iniziano gli screening preliminari dei donatori di sangue o di organo e delle preparazioni di immunoderivati. Queste procedure diagnostiche dette "di primo livello" hanno portato il rischio di trasmissione dell'infezione (il rischio iatrogeno, cioè quello legato a procedure o interventi sanitari) a livelli pressoché vicini allo zero.

Risale invece al **1987** la scoperta del primo farmaco contro l'HIV, la zidovudina (AZT), registrata negli Stati Uniti; i casi di AIDS nel mondo sono saliti a 50000.

Nel **1991**, dieci anni dopo l'inizio dell'epidemia, l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) dichiara che circa dieci milioni di persone in totale hanno contratto il virus, e che circa la metà sono state uccise dall'AIDS. È approvato inoltre un nuovo farmaco, la didanosina, inibitore, come la zidovudina, della trascrittasi inversa.

Nel **1992** cominciano i primi studi per verificare l'efficacia di una terapia con due farmaci contemporaneamente.

Nel **1995** viene approvato il Saquinavir, primo di una nuova classe di farmaci, gli inibitori delle proteasi.

Dalla scoperta del virus ad oggi, sono stati fatti grandi passi in avanti nelle conoscenze sulla patogenesi della malattia, nelle procedure diagnostiche e negli interventi terapeutici. Nonostante questo, l'AIDS resta ancora ai nostri giorni una malattia estremamente invalidante sul piano sia fisico che psicologico, influenzando notevolmente le relazioni sociali. In particolare, è una patologia che, in quasi tutti i casi, è destinata a concludersi, seppur dopo un periodo di tempo più lungo che in passato, nel definitivo collasso del sistema immunitario e nell'esito infausto.

La grande variabilità degli antigeni di HIV rende al momento ancora molto complesso l'allestimento di un vaccino efficace, per cui la prevenzione è rappresentata dall'adozione di misure adeguate per prevenire il contagio.

I numerosi controlli in ambito sanitario, come già detto, hanno ridotto praticamente del tutto il rischio di infezione iatrogena. Più critica è la situazione nella normale popolazione,

specialmente nei Paesi in via di sviluppo (dove è concentrato circa l'80% di tutti i soggetti infetti) o in collettività con particolari atteggiamenti culturali (tossicodipendenti, prostitute, etc.). Nei Paesi industrializzati si è osservato, a partire dalla metà degli anni '90, una tendenza alla diminuzione dei nuovi casi di infezione, collegata probabilmente alla diffusione di norme comportamentali adeguate. Negli ultimi tre o quattro anni però, questa diminuzione si è resa meno evidente, e il numero di nuovi casi sembra stabilizzarsi attorno a cifre ancora consistenti, per via di atteggiamenti e comportamenti "a rischio" che persistono in una parte della popolazione. È necessario sottolineare inoltre che i recenti successi della terapia hanno portato ad una netta diminuzione dei casi di malattia conclamata e a un crollo significativo della mortalità, per cui sono aumentate le persone sieropositive viventi.

A questo si aggiunge tuttavia un relativo aumento del rischio di trasmissione del virus a livello della popolazione^[2].

3.0 STRUTTURA DEL VIRIONE

Il virus dell'HIV, appartenente alla famiglia dei *Retrovirus*, genere *Lentivirus*, è un virus a RNA che, una volta penetrato nell'organismo, viene trascritto in DNA grazie all'enzima retrotrascrittasi (RT) e può così integrarsi nel genoma umano delle cellule bersaglio. Il provirus che in questo modo è venuto a formarsi è un intermedio replicativo necessario per la produzione di copie multiple di RNA e di proteine virali, che avviene utilizzando l'apparato trascrizionale dell'ospite. Queste componenti poi, una volta assemblate, danno origine al virione completo che è così in grado di moltiplicarsi all'interno dell'organismo. All'analisi con microscopio elettronico la particella virale si presenta di forma rotondeggiante con diametro compreso tra i 100 e i 120 nm. Esternamente si può distinguere un involucro pericapsidico detto *envelope*, che riveste il nucleocapside o *core* (Fig. 1).

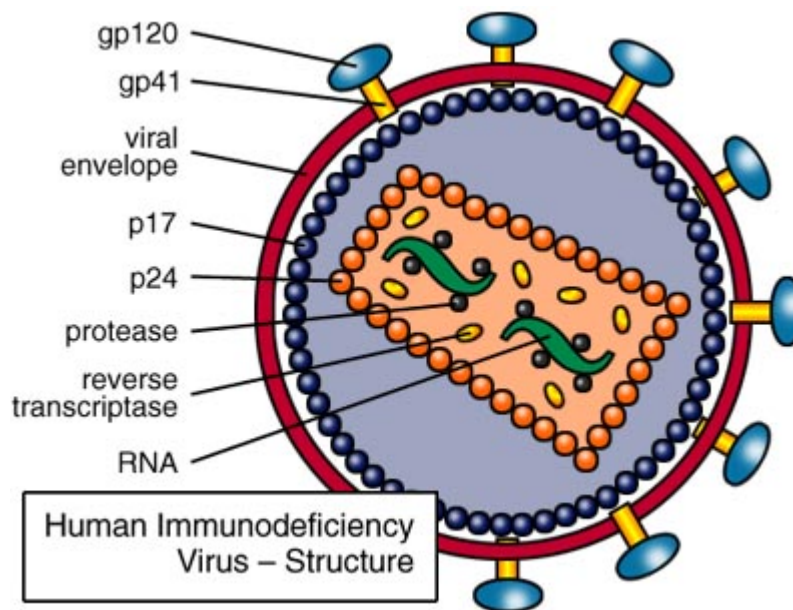


Figura 1: struttura del virione HIV-1(<http://www.cdc.gov/hiv>).

L'*envelope* è costituito da un doppio strato fosfolipidico al quale sono ancorate le glicoproteine virali. Il doppio strato non è di natura virale, ma deriva dalla membrana citoplasmatica della cellula ospite, che il virione acquisisce durante la gemmazione, nelle fasi finali della replicazione. Questo processo avviene generalmente a livello della superficie cellulare ma, nel caso dei macrofagi, i virioni maturano per lo più intracellularmente, gemmando attraverso il reticolo endoplasmatico.

Come conseguenza di questi fenomeni maturativi sull'*envelope* sono presenti perciò sia proteine virali che antigeni di superficie propri della cellula ospite (es antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I e II) e molecole di adesione (*adesine*).

Per quanto riguarda le proteine di origine virale, a livello della superficie esterna si ritrovano strutture di 9-10 nm formate da omotrimeri, i cui singoli componenti sono a loro volta costituiti da due subunità proteiche associate, entrambe prodotte dal gene *env*. Questo gene codifica per un precursore proteico di peso molecolare 160 kDa che, in seguito a scissione proteolitica, dà origine alla glicoproteina di membrana 120 (gp120), che sporge all'esterno della superficie, e alla glicoproteina 41 (gp41), che è collocata nello spessore della membrana (proteina transmembrana).

La glicoproteina gp120, di 515 residui aminoacidici, promuove la penetrazione del virus nella cellula legandosi a specifici recettori di superficie e il sito principale di interazione sul recettore è situato in un'ansa strutturale, che si trova nel primo dominio extracellulare Ig-simile del CD4.

La glicoproteina gp41, di 345 residui aminoacidici, è responsabile sia dell'ancoraggio di gp120 al doppio strato lipidico, sia della fusione tra membrana cellulare e virale in seguito al legame con il recettore, grazie a un peptide fusogenico ricco di glicine e perciò idrofobico.

Nella porzione più interna del doppio strato si trova un guscio elettrondenso di 7 nm che ricorda la matrice presente nella maggior parte dei virus rivestiti di *envelope*. Questo strato è costituito dall'assemblaggio di diverse unità della proteina 17 (p17), la cui parte N-terminale viene miristilata in fase post-traduzionale. La miristilazione consiste nel legame di molecole di acido miristico a residui di glicina posti all'N-terminale della proteina ed è fondamentale per ancorare p17 alla parete interna dell'involucro fosfolipidico e per garantire il corretto assemblaggio delle glicoproteine di tale involucro.

All'interno della struttura virale si trova il nucleocapside o "*core*" del virus, che presenta la tipica forma cilindrico-conica dei Lentivirus ed è costituito dalla proteina p24, codificata dal gene *gag*. Il dominio C-terminale di p24 riveste un ruolo importante per l'assemblaggio e permette la dimerizzazione della proteina, nonché la formazione di oligomeri *gag*, mentre il dominio N-terminale partecipa alla liberazione del genoma dal capsido, quindi è essenziale per l'infettività del virus.

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

4.0 IL GENOMA DI HIV

Il genoma virale misura circa 9,2 Kb ed è costituito da due filamenti di RNA monocatenario lineare a polarità positiva, uniti a livello delle estremità 5' attraverso legami idrogeno in corrispondenza di sequenze complementari.

Le due estremità 3' libere sono poliadenilate (poli A), mentre all'estremo 5' è presente un "capping" (Cap), costituito da residui di guanosina fosforilata e metilata. A una distanza di circa un centinaio di nucleotidi dal 5', all'RNA è appaiata una molecola di tRNA di origine cellulare che funge da primer al momento della retrotrascrizione del genoma virale.

Ciascuna molecola di RNA genomico presenta, agli estremi, due sequenze di basi reiterate, delle quali la più esterna è ripetuta identica ai due estremi (sequenza **R**), mentre quella più interna è caratteristica rispettivamente dell'estremo 5' (sequenza **U5**) e dell'estremo 3' (sequenza **U3**).

Le sequenze U5 ed U3 sono retrotrascritte dalla trascrittasi inversa ad ambedue gli estremi della molecola di DNA provirale che risulta, in tal modo, più lunga rispetto alla molecola di RNA genomico. Si formano di conseguenza, ad entrambi gli estremi della molecola, sequenze identiche non codificanti e altamente conservate (U3, R, U5) denominate **LTR** (*long terminal repeat*), che contengono il *promoter* e l'*enhancer* per la trascrizione del provirus.

All'U3 di LTR 5' si trova infatti il sito promotore "TATA box" e la regione enhancer "CAT box", mentre all'R e U5 di LTR 3' vi è un segnale di poliadenilazione dell'mRNA, che determina la fine della trascrizione.

Funzionalmente dunque queste regioni sono coinvolte nell'incapsidazione dell'RNA virale, nell'integrazione del virus nel genoma dell'ospite e nella regolazione del genoma virale stesso, poiché sono fondamentali per l'innescamento e l'amplificazione della trascrizione.

La molecola di RNA contiene poi sotto-domini strutturali essenziali per il processo di trascrizione del genoma e per la circolarizzazione e integrazione dello stesso nel genoma della cellula ospite.

Dall'estremo 5' è possibile individuare:

- TAR, sito di legame di Tat;

- Il sito di legame del primer, (residui 182-199), che fa da innesco per la trascrizione inversa;
- Il segnale di incapsidamento Ψ , (residui 240-350), fondamentale per l'incorporazione dell'RNA nel virione;
- Il sito di dimerizzazione, (residui 248-271), che facilita l'incorporazione dei due RNA nel virione;
- Il maggior sito donatore di splicing, (residuo 290), utilizzato nella generazione di tutti gli mRNA subgenomici;
- La regione Gag-Pol, (residui 1631-1672), comprensiva di una sequenza eptanucleotidica e di una forcina, che promuovono lo spostamento del sito di lettura ribosomiale (-1), favorendo la traduzione di una poliproteina Gag-Pol con una frequenza del 5-10%;
- RRE (Rev Response Element), sito di legame di Rev;
- Siti accettori di splicing presenti in diverse regioni dell'RNA, che garantiscono la produzione di un elevato numero di prodotti di splicing (siti principali nei residui 5358 e 7971);
- Il segnale di poliadenilazione, (residui 9205-9210), che costituisce l'estremo 3'.

Caratteristica peculiare di HIV-1 è di possedere sequenze geniche con più schemi di lettura aperti (**ORF**, open reading frame). Ciò permette al virus di codificare una più ampia gamma di possibili proteine partendo da un frammento genico limitato.

Il genoma di HIV-1 possiede 9 geni fondamentali, di questi tre (*gag*, *pol*, *env*) sono geni strutturali tipici di tutti i Retrovirus, essenziali per codificare gli elementi necessari per la replicazione virale.

Vi sono poi geni regolatori (*rev*, *tat*) e geni accessori (*nef*, *vpr*, *vpu* e *vif*), che permettono ad HIV una più complessa interazione con la cellula ospite ^[3,4] (**Fig. 2 e Tab. 2**).

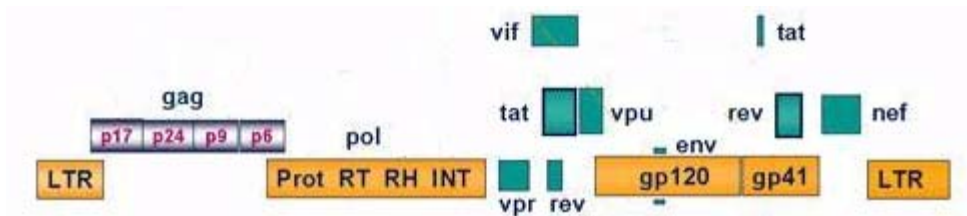


Fig. 2: Mappa genomica di HIV-1 (<http://www.cdc.gov/hiv>).

LTR	Integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite; sito di legame per i fattori di trascrizione della cellula ospite.
Gag	Proteine del nucleocapside e della matrice.
Pol	Trascrittasi inversa, proteasi, integrasi e ribonucleasi.
Env	Proteine dell'envelope virale (gp120 e gp40) che mediano il legame con CD4 e coi corecettori e la fusione della membrana del virus con quella cellulare.
Vif	Potenzia l'infettività delle particelle virali.
Vpr	Favorisce il trasporto nel nucleo del DNA virale; arresto nella fase G ₂ del ciclo cellulare.
Tat	Necessaria per l'estensione dei trascritti virali.
Rev	Favorisce l'esportazione dal nucleo di RNA virali non andati incontro a splicing.
Vpu	Riduce l'espressione di CD4 da parte della cellula e favorisce la liberazione del virus.
Nef	Riduce l'espressione di CD4 da parte della cellula e favorisce la liberazione del virus; riduce l'espressione di MHC di classe I da parte delle cellule infette.

Tabella 2 (da: Immunologia Cellulare e Molecolare. Abbas – Lichtman – Pober)

5.0 PROTEINE STRUTTURALI DI HIV

Analogamente a tutti i Retrovirus, il genoma di HIV contiene i tre geni strutturali organizzati, dall'estremo 5' al 3', nel seguente ordine: *gag* (group specific antigen), *pol* (polymerase), *env* (envelope).

I geni *gag* e *pol* sono inizialmente trascritti in un unico mRNA, che viene tradotto in una poliproteina di 180 kDa (p180), successivamente scissa da una proteasi virale.

Dal taglio del precursore si forma così una proteina di 55 kDa (p55) e le tre proteine a funzione enzimatica associate al virione, rappresentate da una proteasi virus-specifica (p10 o PR), da una trascrittasi inversa (p51/66 o RT) e da un'integrasi (p32 o IN).

La suddivisione di p55 porta alla formazione della proteina della matrice (p17 o MA), della proteina capsidica (p24 o CA), della proteina p15 che, nel virione in formazione, viene ulteriormente scissa nella proteina del nucleocapside (p9 o NC) e in p7, necessarie per un corretto incapsidamento dell'RNA.

Il gene *env* viene tradotto in una proteina (p88) rapidamente glicosilata, così da raggiungere il peso di 160 kDa (gp160), dal cui taglio proteolitico in fase di gemmazione derivano le due glicoproteine virus-specifiche di membrana, gp120 e gp41.

Una volta sintetizzata, la poliproteina gp160 può interagire, a livello del reticolo endoplasmatico, con le molecole CD4 sintetizzate dalla cellula, ma tale legame viene contrastato dalla proteina virale Vpu, che induce la degradazione delle molecole CD4^[5].

La glicoproteina gp160 viene quindi veicolata sulla superficie cellulare ed esposta all'esterno. Per impedire un'eventuale interazione tra essa e le molecole CD4 espresse in superficie interviene la proteina virale Nef, che promuove l'endocitosi e la degradazione delle molecole CD4 di superficie a seguito dell'infezione.

Quindi due diversi messaggeri derivano dall'mRNA retrovirale: uno di lunghezza completa che porta alla traduzione delle poliproteine Gag e Pol, l'altro subgenomico, più breve, ottenuto grazie a un meccanismo di splicing, e che origina il prodotto del gene *env*.

Per quanto riguarda le poliproteine Gag e Pol, la prima verrà prodotta dalla traduzione dell'mRNA dal codone d'inizio fino al primo codone di terminazione, il superamento del quale determina invece l'espressione di *pol*; a questo punto diversi meccanismi di traduzione possono intervenire in base agli schemi di lettura dei due geni.

Quando essi sono in *frame* si ha la soppressione del codone di stop interposto tra le due sequenze, se invece gli schemi di lettura sono diversi o sovrapposti la poliproteina è prodotta attraverso un meccanismo di “scivolamento” ribosomiale.

Questi meccanismi di antiterminazione sono però poco efficienti e perciò la produzione di Gag è circa 20 volte maggiore rispetto a Gag-Pol.

Oltre ai geni codificanti proteine strutturali, il genoma di HIV contiene anche 6 geni regolatori e accessori: i primi sono rappresentati da *Tat* e *Rev*, mentre i secondi da *Nef*, *Vpr*, *Vif* e *Vpu*. I prodotti di questi geni giocano un ruolo essenziale nel ciclo replicativo virale e nella sintesi di macromolecole ad esso correlate (**Fig. 3**).

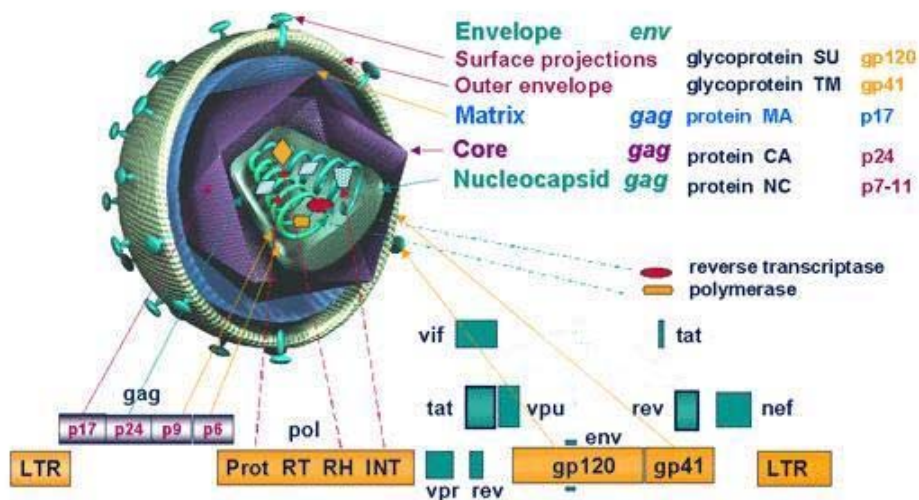


Fig. 3: Struttura del virus: geni virali e le proteine da essi codificate (<http://www.cdc.gov/hiv>).

5.1 Poliproteina Pol

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

La **proteasi (PR o p10)** è una proteina di 99 residui aminoacidici, che agisce in forma di dimero. Essa interviene nell'elaborazione delle proteine virali a partire dai precursori poliproteici e gioca perciò un ruolo fondamentale nella maturazione della particella virale. PR agisce sia a livello della superficie cellulare durante il rilascio dei virioni, sia all'interno delle particelle già fuoriuscite dalla cellula, dove scinde i precursori Gag e Gag-Pol ^[6]. La proteina, incapsidata come parte del precursore Pol all'interno dei virioni al momento della loro fuoriuscita dalla cellula, attiva una serie di riarrangiamenti conformazionali della progenie ancora immatura e non infettante e promuove il taglio di precursori poliproteici, consentendo così la maturazione e l'infettività della particella virale. Il sito attivo dell'enzima, posto nell'interfaccia del dimero, è collocato a livello del residuo Asp25, esposto da ogni monomero ed essenziale per la funzione catalitica; inoltre è presente una sequenza altamente conservata caratteristica di tutte le aspartil-proteasi (Asp-Thr-Gly) e una struttura a cerniera importante per il legame dell'enzima al substrato.

La **Trascrittasi inversa (RT)** è un eterodimero con una subunità di 560 aminoacidi (p66) e una da 440 residui (p51), entrambe derivate dalla poliproteina Pol, contenenti ciascuna un dominio ad attività polimerasica costituito da quattro regioni. RT è un enzima chiave per il ciclo replicativo di HIV, poiché permette la retrotrascrizione del genoma virale a RNA nella forma provirale a DNA, grazie alla sua azione DNA polimerasica RNA dipendente.

L'enzima viene incapsidato nella particella di HIV per poter svolgere la sua azione una volta avvenuta la liberazione del genoma virale dal capsido, fenomeno denominato *uncoating*.

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

Nonostante le sequenze aminoacidiche delle due subunità appaiano simili, solo sulla p66 è presente il sito catalitico, caratterizzato da tre residui altamente conservati (Asp 110, Asp185, Asp186), mentre la p51 si presenta con una conformazione chiusa, funzionalmente inattiva^[7].

Il meccanismo enzimatico in cui è coinvolta la trascrittasi inversa ha inizio all'interno della particella virale, quando questa non ha ancora iniziato la sua azione infettiva verso la cellula bersaglio. A questo livello avviene l'*annealing*, ovvero l'appaiamento del tRNA che fa da primer, di origine cellulare e posto all'interno del virione durante l'assemblaggio, col genoma virale, in particolare con la sequenza PBS (Primer Binding Site), posta vicino all'estremo 5'. Il tRNA contatta così sia l'interfaccia del dimero della retrotrascrittasi che la regione C-terminale di p66. Qualunque tRNA può essere utilizzato dall'RT come primer, ma si è visto come la retrotrascrizione sia più efficiente qualora sia presente un tRNA caricato con l'aminoacido lisina (tRNA^{Lys}) oltre ad un'appropriata concentrazione di ioni Mg²⁺.

Le reazioni successive avvengono nella cellula ospite, a livello citoplasmatico, dopo la liberazione del genoma virale.

Caratteristica tipica della retrotrascrittasi virale è la sua scarsa fedeltà replicativa, essendo priva di un'attività esonucleasica di controllo in direzione 3'→5'; questa caratteristica dell'enzima porta alla formazione di circa 10 errori per ciclo di sintesi, originando così un'alta frequenza di variabilità nucleotidica fra i diversi ceppi.

Da ciò risulta evidente come sia quindi difficile elaborare una strategia terapeutica efficace contro questo virus, capace di modificare con tale rapidità le proprie caratteristiche antigeniche ed enzimatiche.

L'**endonucleasi-integrasi (IN o p32)** è una proteina di 288 aminoacidi che agisce sotto forma di tetramero a livello del nucleo cellulare, dove catalizza una serie di passaggi che portano all'integrazione del DNA provirale nel genoma della cellula ospite^[8]. Strutturalmente ogni monomero è costituito da tre domini caratterizzati da una specifica struttura: il dominio N-terminale, quello catalitico e il C-terminale.

Il primo dominio, compreso tra gli aminoacidi 1 e 50, è coinvolto nella dimerizzazione e contiene un sito di legame per lo zinco coordinato con due cisterne e due istidine, inoltre

contiene una struttura HLH (*helix-loop-helix*) analoga a quella presente nelle proteine leganti il DNA.

Il dominio catalitico, residui 50-212, è caratterizzato dalla presenza di un motivo conservato, il quale lega Mg^{2+} o Mn^{2+} , ioni metallici necessari perché avvenga l'integrazione.

L'ultimo dominio, compreso tra i residui 220 e 270 e strutturalmente simile al dominio SH3, è coinvolto sia nella dimerizzazione, sia nella formazione di legami aspecifici con il DNA; contiene infatti un solco a forma di doppia sella che stabilisce un legame con i filamenti di DNA tramite la Lys264 contenuta nella sequenza del dominio.

All'interno delle cellule infette si possono osservare tre forme di DNA virale: DNA lineare delimitato da due LTR, DNA circolare con una LTR e DNA circolare con due LTR. Solo il DNA lineare è substrato dell'enzima integrasi. L'integrazione può avvenire in diversi siti essenzialmente casuali, benché si sia evidenziata una preferenza per le sequenze di DNA particolarmente condensate, contenute nella struttura nucleosomica. Il provirus integrato presenta alcune differenze rispetto alla forma non integrata, infatti ha perso alcuni nucleotidi alle estremità e le sequenze virali sono affiancate da brevi sequenze ripetute del sito bersaglio dell'ospite.

E' possibile distinguere diverse fasi nel processo di integrazione: la prima consiste nel riconoscimento delle estremità del DNA virale a livello dei siti AAT e nella rimozione, da parte dell'enzima, di due paia di basi dalle estremità 3' di ogni filamento di DNA del virus, esponendo così il dinucleotide CA, altamente conservato tra i retrovirus.

Nella seconda fase tali estremità si legano covalentemente con le estremità 5' del DNA cellulare, a sua volta clivato in corrispondenza del sito bersaglio di integrazione. Nel terzo passaggio si ha la riparazione, pare ad opera di enzimi cellulari, delle giunzioni tra DNA virale integrato e il DNA genomico della cellula ospite e si generano così le ripetizioni dirette di 5 paia di basi che affiancano le sequenze virali.

Nel meccanismo di integrazione sembrano essere coinvolte anche alcune proteine cellulari, ad esempio Ini1, che influisce sull'efficienza della trascrizione e HMG I, associata alla formazione di un complesso di pre-integrazione.

5.2 Poliproteina Env

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

Gp120 o **SU** (*surface*) è una proteina di 515 residui aminoacidici, la cui funzione principale è quella di promuovere il legame del virus alla membrana cellulare della cellula ospite mediante il riconoscimento della molecola CD4, considerata il principale recettore di HIV. CD4 è presente su linfociti T e monociti/macrofagi ed è costituito da quattro domini extracellulari Ig-simili.

Il legame gp120-CD4 non è però sufficiente a consentire l'ingresso del virus nella cellula, è infatti richiesta anche la presenza di specifici recettori per le chemochine (una famiglia di molecole coinvolte in svariate attività biologiche, ad esempio la chemiotassi cellulare), che svolgono la funzione di corecettori virali^[9]. Sulla base della specificità di queste molecole HIV può essere suddiviso in due classi: alla prima appartengono i virus a tropismo linfocitario sincizio-inducenti, che riconoscono come corecettore la proteina CXCR4, alla seconda i ceppi a tropismo macrofagico non inducenti la formazione di sincizi, che riconoscono il corecettore CCR5.

E' il loop V3 di gp120 a recare determinanti che specificano selettivamente l'interazione con i corecettori cellulari, fornendo la chiave molecolare del tropismo verso linfociti T o macrofagi.

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

Perciò in gp120 sono presenti due zone ben distinte, la prima responsabile dell'ancoraggio al recettore CD4 (residui 400-430), la seconda delle modificazioni della molecola che portano all'esposizione del peptide fusogeno (residui 313-337).

Gp120 poi interviene direttamente nella patogenesi della malattia inducendo, dopo interazione con CD4 delle cellule sensibili, una serie di segnali negativi per la sopravvivenza cellulare e dando inizio al processo di morte cellulare programmata o apoptosi, anche in assenza di infezione da parte del virus.

Esistono inoltre ulteriori modalità di legame che permettono ad HIV di penetrare nelle cellule, ad esempio il legame di virus rivestiti di anticorpi ai recettori per il frammento Fc delle Ig (ciò spiega l'aumentata infettività virale mediata da anticorpi), e l'elevata affinità di gp120 per il glicolipide galattosio-ceramide, presente sulla superficie di linee cellulari gliali e di neuroblastoma.

Gp41 o **TM** è una proteina di 345 residui aminoacidici situata nella membrana virale, con l'estremo COOH all'interno e l' NH_2 all'esterno del virione. E' coinvolta sia nell'ancoraggio di gp120 all'envelope, sia nel meccanismo di fusione tra la membrana virale e quella della cellula ospite in seguito al legame con il recettore.

L'estremo N-terminale di gp41 è responsabile dell'ancoraggio di gp120 alla membrana grazie al legame con la regione COOH-terminale della stessa, mentre l'attività fusogena è mediata dalla presenza di una sequenza altamente apolare, ricca di glicine, che risiede in prossimità dell'estremo NH_2 e viene esposta in seguito al legame di gp120 al recettore CD4 ^[10].

5.3 Poliproteina Gag

Il gene *gag* codifica per quattro proteine originate dal taglio proteolitico del precursore p55: La proteina della matrice, la proteina capsidica, la proteina del nucleocapside e p6.

La **proteina della matrice** (MA o p17), componente N-terminale della poliproteina Gag, si posiziona sul lato interno della membrana cellulare nelle zone in cui il virione fuoriuscirà dalla cellula, andando così a formare la matrice della particella virale.

Essa riveste un ruolo importante per il trasporto dei precursori gag e gag-pol verso i siti di assemblaggio virale a livello della membrana cellulare. La funzione della proteina è resa possibile da due proprietà strutturali: la presenza di un gruppo miristilato N-terminale e di residui basici localizzati a livello dei primi 50 aminoacidi. Dal punto di vista strutturale MA si presenta in una forma trimerica funzionalmente attiva, in cui i residui basici sono a livello della superficie del trimero^[11]. Il corretto posizionamento della proteina sulla membrana citoplasmatica si basa innanzitutto sull'inserimento di ciascun gruppo miristilato nel doppio strato lipidico, seguito da interazioni tra i residui basici e la parte idrofila dei fosfolipidi di membrana.

MA contribuisce, inoltre, all'inserimento delle glicoproteine derivate da *env* all'interno della particella virale; queste proteine sono caratterizzate da lunghe code citoplasmatiche, che vengono inserite nelle cavità originate nella configurazione spaziale della proteina trimerica. E' stato infine osservato un coinvolgimento della proteina della matrice nell'induzione dell'infezione di cellule non proliferanti, in particolare i macrofagi, grazie alla presenza di un sito NLS (*Nuclear Localization Signal*), che facilita il trasporto del complesso ribonucleico virale liberato dal capsido verso il nucleo della cellula infettata.

La **proteina del capsido** (CA o p24), presente in circa 2000 copie in ogni struttura virionica, costituisce il "core" del virus. Il dominio C-terminale della proteina (residui 152-231) interviene nell'assemblaggio del virus, nella dimerizzazione della proteina stessa e nella formazione di oligomeri Gag. E' costituito da una struttura distesa seguita da quattro α -eliche e contiene una sequenza compatta detta MHR (*Major Homology Region*), in cui si trovano venti aminoacidi molto conservati, stabilizzata da legami idrogeno tra i

quattro residui a minor variabilità^[12]. E' la regione MHR che, interagendo con Gag, permette l'ingresso di Gag-Pol nel virione in formazione.

Il dominio N-terminale (residui 1-151) è invece essenziale per l'infettività poiché, grazie all'interazione con una chaperonina cellulare, la ciclofillina A, promuove l'incorporazione della proteina nel virione e partecipa all'*uncoating* virale.

La **proteina del nucleocapside** (NC o p9), formata da 55 residui aminoacidici, contiene due domini *zinc fingers* fiancheggiati da residui basici che permettono che essa si complessi con il genoma del virus. La funzione primaria di NC è quella di portare l'acido nucleico completo all'interno della struttura virionica in formazione, legandosi tramite le strutture *zinc fingers* al segnale di incapsidamento (ψ , *packaging signal*) dell'RNA, strutturalmente costituito da tre strutture a forcina localizzate in prossimità del sito donatore di splicing maggiore. La più nota delle tre è la forcina che ha al suo interno la regione del genoma responsabile della dimerizzazione delle due copie genomiche presenti nel virione maturo. Poiché p9 è una proteina basica, riveste l'RNA genomico nel core della particella, proteggendolo in questo modo dalle nucleasi. Inoltre, come fattore *chaperon*, partecipa all'*annealing* del tRNA-primer, allo srotolamento delle strutture secondarie dell'RNA, alle reazioni di scambio dei filamenti durante la retrotrascrizione e nell' induzione dell'integrazione.

La proteina **p6**, costituita da 51 aminoacidi C-terminali di Gag, è importante per l'incorporazione di Vpr durante l'assemblaggio virale.

La proteina contribuisce inoltre all'efficiente rilascio del virione dalla cellula ospite.

5.4 Proteine regolatrici ed accessorie di HIV

Il gene *Tat* (*Trans-Activator of Transcription*) è costituito da due esoni e codifica una proteina di 86 aminoacidi, del peso di 14-15 kDa, la cui forma funzionante deriva da splicing multipli dell'mRNA. Tat rappresenta uno dei primi prodotti del virus poiché svolge un ruolo essenziale nel trans-attivare la trascrizione delle proteine virus-specifiche agendo sul complesso LTR 5' e consente quindi di incrementare di circa 100 volte la produzione di mRNA virale^[13,14]. Essa può:

- Legarsi, tramite un dominio ricco in arginine, ad una struttura a *loop* alla sequenza TAR (tat responsive region) presente al 5' degli mRNA virali nascenti e facilitare il reclutamento di fattori trascrizionali cellulari e di adattatori trascrizionali, potenziando così la funzione del complesso trascrizionale virale (meccanismo TAR-dipendente).
- Interagire attraverso un *loop* autocrino con recettori di membrana della cellula infetta, innescando così una cascata di “*signalling*” al nucleo che si traduce in un' aumentata attivazione dei fattori trascrizionali disponibili nella cellula (c-Fos, Creb), con conseguente incremento della trascrizione del provirus (meccanismo TAR-indipendente).

Il legame di Tat alla struttura ribonucleica prevede una prima interazione tra la sequenza ricca di arginine e una guanina presente nel solco maggiore dell'RNA, seguita dalla stabilizzazione del complesso sia tramite contatti addizionali coinvolgenti i gruppi fosfato presenti nella struttura dell'acido nucleico, sia attraverso la formazione di un triplice appaiamento U-A:U tra una base localizzata in una protuberanza di TAR e una coppia di basi presenti più a monte.

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

Tat può poi essere eliminata all'esterno della cellula infetta e andare a interagire con le cellule circostanti non infette (azione paracrina), le quali la internalizzano per endocitosi. Tat può perciò agire transattivando la trascrizione di numerosi geni cellulari produttori di fattori di crescita e citochine (TNF, IL6).

Ricerche recenti hanno inoltre dimostrato che cellule transfettate col gene *tat* risultano protette dall'apoptosi e hanno quindi un'aumentata capacità di sopravvivenza e proliferazione. In realtà pare che questa proprietà di Tat sia funzione della sua concentrazione: a concentrazioni fisiologiche svolge l'azione protettiva, mentre a concentrazioni elevate ha effetto opposto, inducendo la comparsa dell'apoptosi.

Il gene **Rev** (*Regulator of Virion Expression*), costituito da due esoni sovrapposti a quelli di *tat*, codifica per una proteina di 116 residui aminoacidici (p19) a localizzazione prevalentemente nucleare, che gioca un ruolo cruciale nell'infezione virale per il suo ruolo di regolatore "differenziale". Essa consente infatti la transizione dalla produzione di trascritti primari sottoposti a più eventi di *splicing* (che codificano le proteine regolatorie e accessorie Tat, Rev e Nef), a trascritti prodotti da un singolo *splicing* e codificanti proteine strutturali. In questo modo il gene controlla il passaggio da un'infezione quiescente ad una crescita virale attiva.^[15]

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

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

Il gene **Nef** (*Negative regulatory Factor*) si trova nella regione 3'LTR e codifica per una proteina di 27 kDa (p27) miristilata all'N-terminale e a localizzazione prevalentemente citoplasmatica, che è la prima proteina ad accumularsi nelle cellule successivamente all'infezione con HIV.

Si pensava che svolgesse un'azione di regolazione negativa della trascrizione virale, che veniva così rallentata.

Si è successivamente visto che essa possiede diverse attività: come Vpu maschera l'espressione di molecole MHC di classe I e inoltre riduce i livelli di espressione di CD4 alla superficie della cellula, stimolando l'endocitosi di CD4 e la loro distruzione lisosomiale.

Nef poi si associa con diverse chinasi cellulari nei linfociti T helper ed aumenta l'infettività del virus. Se Nef è presente i virioni prodotti sono dieci volte più infettanti.

Il gene *Vpr* (*Viral Protein R*), localizzato tra i geni *pol* ed *env* e parzialmente embricato con il gene *vif* e con l'esone iniziale di *tat*, codifica una proteina di 96 aminoacidi (p15), incorporata nelle particelle virali attraverso l'interazione con p6.

La proteina, che sembra intervenire nella riattivazione dell'infezione latente, permette il rapido trasporto del complesso ribonucleoproteico al nucleo della cellula infettata, subito dopo l'*uncoating* del virus, grazie a specifiche sequenze di traslocazione nucleare dette NLS (*Nuclear Localization Signal*). Esse sono particolarmente importanti per la localizzazione nucleare in cellule quiescenti come i macrofagi, poiché consentono il trasporto anche in assenza di breakdown mitotico del nucleo.

Gli NLS sono costituiti da due α -eliche N-terminali, responsabili della localizzazione della proteina a livello dei pori nucleari^[16].

Vpr è responsabile anche del blocco del ciclo cellulare in fase G2 e dell'induzione della condensazione cromosomica, nonché della morte per apoptosi delle cellule T, in caso di una sua espressione prolungata. L'intervento di Vpr a questo livello avviene nella fase precedente la defosforilazione di una chinasi ciclina-dipendente necessaria per iniziare il processo mitotico. Per l'arresto in G2 sono di fondamentale importanza gli aminoacidi localizzati nella regione C-terminale della proteina virale e si è inoltre osservato come diverse proteine cellulari interagiscano con essa, ad esempio la subunità regolatoria della fosfatasi PP2A (*Protein Phosphatase 2A*), che regola il passaggio dalla fase G2 alla mitosi.

Il gene *Vif* (*Viral Infectivity Factor*), la cui sequenza nucleotidica si trova tra *pol* ed *env*, codifica una proteina di 192 aminoacidi del peso molecolare di 23 kDa (p23), importante per la produzione di virioni maturi altamente infettanti in cellule permissive e semipermissive.

La proteina si trova sia nel citoplasma delle cellule ospiti, sia all'interno dei virioni liberi^[17]. Essa viene inoltre regolata tramite modifiche post-trascrizionali; si è visto infatti come la sua funzionalità sia alterata da mutazioni che interessano uno dei tre siti di fosforilazione del residuo Ser144.

Questa proteina, indispensabile per la produzione di virus infettanti, partecipa all'assemblaggio e alla maturazione delle particelle, intervenendo nell'elaborazione finale dei prodotti del gene *env*. Inoltre Vif pare sia coinvolta anche nell'adsorbimento e penetrazione nella cellula ospite, infatti ceppi virali di laboratorio, privi del gene *Vif*, sono ancora in grado di replicarsi e produrre virioni normali, incapaci però di infettare cellule sensibili. La proteina è perciò essenziale per un'efficiente trasmissione del virus in cellule sane, mentre non influenza la diffusione cellula-cellula, che risulta solo ridotta in assenza del gene *vif*^[18].

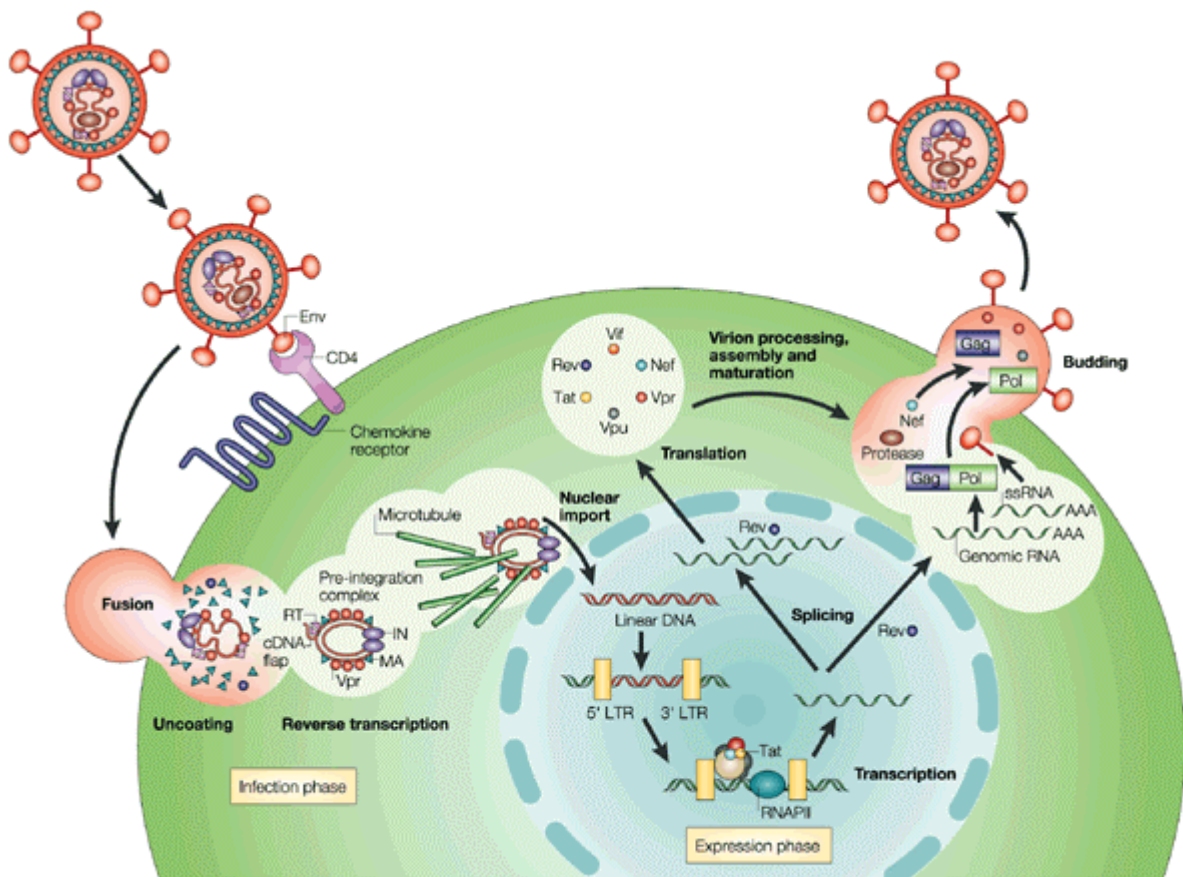
Il gene **Vpu** (*Viral Protein U*), codifica per una proteina di membrana di 81 aminoacidi, del peso di 16 kDa (p16), con un dominio citoplasmatico C-terminale e uno idrofobico N-terminale di 24 residui. Anche questa proteina viene regolata attraverso modificazioni post-trascrizionali, va infatti incontro a una fosforilazione a livello dei residui Ser52 e Ser56. Funzionalmente la proteina interviene nell'assemblaggio, nella maturazione del virione e nella liberazione della progenie virale. Per quanto riguarda il processo maturativi, p16 promuove la degradazione di CD4 responsabili della ritenzione, a livello del reticolo endoplasmatico, delle proteine Env neosintetizzate, promuovendo così la loro esposizione sulla membrana cellulare. Il meccanismo alla base della degradazione pare coinvolgere il proteasoma cellulare, poiché un inibitore di quest'ultimo blocca l'intero processo.

La proteina, inoltre, regola negativamente l'espressione delle molecole MHC di classe I, mascherando così il virus al sistema immunitario e impedendo il riconoscimento e l'uccisione delle cellule infette da parte dei linfociti T citotossici.

Vpu può infine stimolare, attraverso il suo dominio N-terminale, il rilascio non specifico delle particelle virioniche, agendo sotto forma di canale ionico del potassio.

6.0 CICLO DI REPLICAZIONE

Il ciclo replicativo di HIV-1 è costituito da diverse fasi: dopo l'ingresso nella cellula ospite si assiste alla trascrizione dell'RNA virale in DNA, ad opera della trascrittasi inversa. Una volta formata la molecola di DNA bicatenario, questo si integra nel genoma cellulare e viene quindi trascritto a mRNA dall'apparato trascrizionale della cellula. La traduzione delle proteine virali fa sì che si formino nuove particelle virali, contenenti la molecola di RNA, che verranno rilasciate per gemmazione dalla cellula infetta (**Fig. 4**).



Nature Reviews | Immunology

Fig. 4: ciclo replicativo di HIV

6.1 Adesione e penetrazione

Il primo passo del ciclo replicativo consiste nell'interazione tra le proteine dell'envelope virale e i recettori di superficie della cellula ospite, in particolare l'antirecettore virale **gp120** lega ad alta affinità il recettore **CD4** presente sui linfociti T helper (considerati il bersaglio d'elezione) e sui monociti/macrofagi. Anche altre cellule dell'organismo, quali le cellule dendritiche e le gliali, possono essere infettate seppure a bassi livelli, sfruttando l'interazione con altri recettori non CD4 a bassa affinità (ad esempio il galattosio-ceramide delle cellule gliali). HIV può inoltre penetrare attraverso un meccanismo alternativo, rappresentato dal legame di particelle virali ricoperte da anticorpi specifici con i recettori per il frammento Fc delle Ig, esposti sulle cellule bersaglio. Questo meccanismo permette di comprendere come l'aumento dell'infettività virale sia associato alla risposta anticorpale.

Perché una cellula possa essere infettata dal virus HIV-1 la presenza del solo recettore CD4 non è però sufficiente, si è visto infatti che cellule murine transfettate con CD4 umano non subiscono l'infezione. Da questa osservazione sono stati effettuati studi che hanno permesso di identificare corecettori, la cui presenza risulta essenziale per l'infezione. Questi corecettori sono stati identificati tra i recettori per le chemochine, in particolare l'interazione tra gp120 e **CXCR4** è necessaria per la penetrazione dei linfociti T, mentre quella con **CCR5** per la penetrazione di monociti/macrofagi^[19].

Il meccanismo attraverso il quale avviene la fusione tra le strutture virali e la membrana cellulare si basa su variazioni conformazionali di gp120, che portano all'esposizione e all'attivazione di gp41, la cui interazione diretta con la membrana cellulare attraverso la sua porzione NH₂ terminale (peptide fusogeno), determina la fusione dell'envelope virale con il doppio strato lipidico della cellula bersaglio (**Fig. 5**).

Avvenuta la fusione il core del virus penetra nella cellula bersaglio, mentre il rivestimento glicoproteico dell'envelope resta all'esterno della cellula.

Una volta all'interno della cellula il virus va incontro a un processo di svestimento ("*uncoating*") attraverso il quale il rivestimento proteico del core viene degradato e nel citoplasma della cellula sono liberati il genoma a RNA e gli enzimi virali.

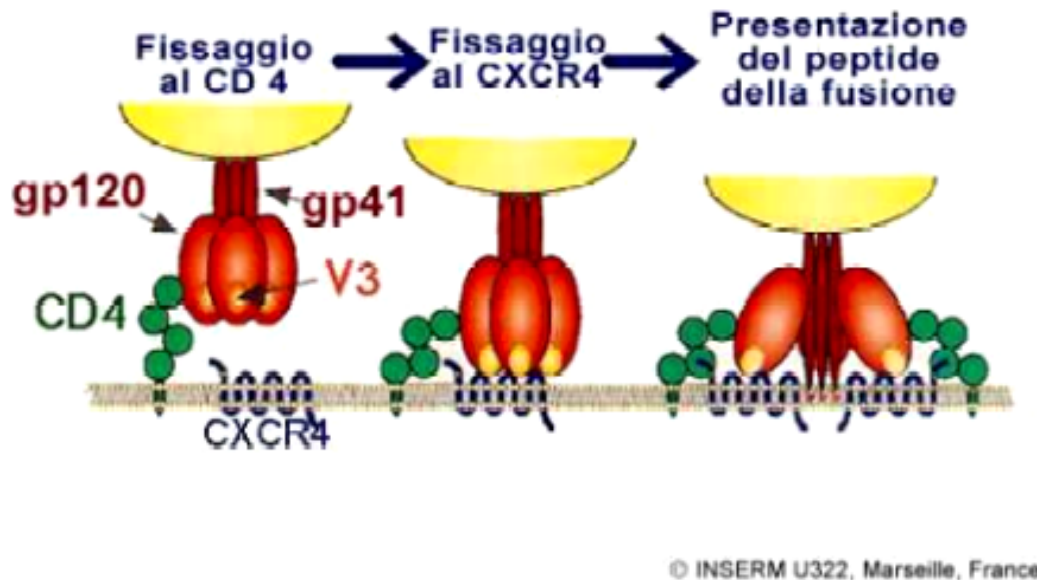


Fig. 5: Adesione e fusione del virus alla cellula bersaglio.

6.2 Retrotrascrizione

Il processo di retrotrascrizione avviene nel complesso nucleoproteico e richiede il coordinamento delle attività della RT virale, eterodimero costituito dalle subunità p51 e p66, una avente attività polimerasica in direzione $5' \rightarrow 3'$ e l'altra ad attività Rnastica, in grado di degradare l'RNA dell'ibrido DNA-RNA. Come detto in precedenza la fedeltà della RT è relativamente bassa poiché l'enzima è privo dell'attività esonucleasica di controllo, su ha perciò un'elevata frequenza di variabilità nucleotidica fra i diversi ceppi (10 errori stimati per ciclo), che determina l'insorgenza varianti resistenti alle strategie terapeutiche.

La trascrizione inizia con la sintesi di un filamento di DNA complementare al filamento di RNA virale (**Fig. 6**). Il neofilamento viene prodotto in due fasi: inizialmente vengono sintetizzati un centinaio di nucleotidi a partire dalla molecola di tRNA legata al genoma in prossimità dell'estremo $5'$; quando l'enzima raggiunge l'estremità entra in gioco l'attività ribonucleasica dell'RT, che rimuove le sequenze di RNA ibridizzate al DNA neoformato. Rimane così esposto un piccolo tratto di DNA a singolo filamento (sequenza R) complementare al segmento presente all'estremo $3'$; è a questo punto che si verifica il

primo salto della polimerasi, che si trasferisce al 3' grazie alla complementarità delle due sequenze R e riprende la copiatura in DNA della sequenza di RNA virale. Terminata la sintesi interviene l'attività ribonucleasica della RT, che elimina la maggior parte dell'RNA ibridizzato, lasciando solamente un innesco polipurinico tra il gene *env* e la sequenza U3. Da questo nuovo innesco inizia l'estensione del secondo filamento di DNA, trascritto sullo stampo del DNA neoprodotto ed in questo caso l'enzima funziona da DNA polimerasi-DNA dipendente. Analogamente a quanto descritto in precedenza, una volta raggiunta l'estremità del filamento interviene l'attività Rnastica dell'enzima, che rimuove l'innesco polipurinico dal secondo filamento di DNA e il tRNA dal primo, esponendo la sequenza PBS. Sfruttando nuovamente la complementarità di sequenza (tra i due siti PBS), la polimerasi effettua un secondo salto che la riporta all'estremo 3'.

Gli errori di sintesi prodotti dalla RT nella prima tappa di retrotrascrizione saranno introdotti nel genoma virale, mentre gli errori prodotti durante la sintesi del secondo filamento possono essere corretti dai sistemi di riparazione cellulari, essendo incorporati in una doppia elica di DNA, che rappresenta il substrato naturale dei sistemi di correzione. Queste reazioni avvengono nelle sei ore successive alla penetrazione del virus nella cellula ospite e si svolgono nel citoplasma. Perché possa avvenire la retrotrascrizione è necessario un eccesso di enzima rispetto allo stampo di RNA genomico, probabilmente per sopperire alla scarsa processività della RT.

Al termine della trascrizione il DNA virale contiene ad entrambe le estremità le sequenze LTR (*Long Terminal Repeat*), invece delle sequenze "corte" presenti nell'RNA (STR) e prende il nome di **provirus** e, associato alle proteine p17 e integrasi, forma il complesso di pre-integrazione.

6.3 Integrazione

Il complesso di pre-integrazione è trasportato nel nucleo, dove il DNA virale si integra nel genoma cellulare, grazie all'intervento di un altro enzima virale, **l'integrasi** (prodotto del gene pol) (**Fig. 6**).

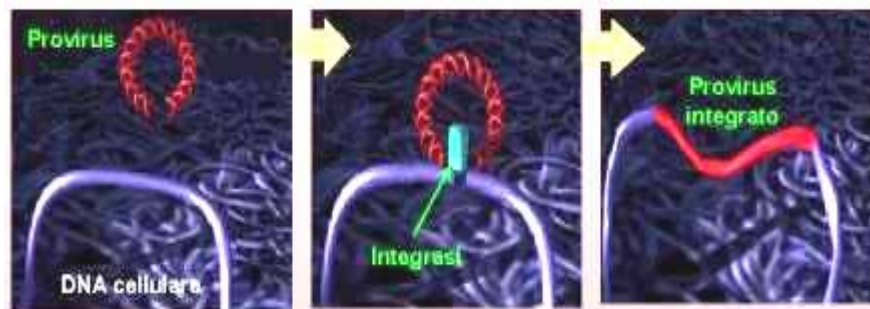


Fig.6: Integrazione del provirus nel DNA della cellula ospite (<http://www.cdc.gov/hiv>).

L'integrazione è casuale e può avvenire in ogni punto del DNA cellulare, anche se sono stati descritti alcuni siti preferenziali. A questo punto il DNA virale si duplica ad ogni divisione con il materiale genetico della cellula, rendendo l'infezione permanente e il provirus integrato un elemento stabile.

Il meccanismo d'azione dell'integrasi si basa sul riconoscimento dei siti ATT presenti all'estremità 3' del DNA virale, seguito dalla rimozione di due paia di basi dalle suddette estremità, con conseguente esposizione del dinucleotide CA, altamente conservato fra i retrovirus. Tali estremità vengono poi legate covalentemente con le estremità 5' del DNA cellulare, a sua volta digerito in corrispondenza del sito bersaglio di integrazione. Infine, probabilmente grazie ad enzimi cellulari, si ha la riparazione delle giunzioni tra DNA virale integrato e DNA genomico dell'ospite con formazione del provirus integrato, fiancheggiato da ripetizioni dirette di 5 paia di basi.

Dopo l'integrazione il DNA virale rimane associato al genoma della cellula senza andare incontro necessariamente alla trascrizione, anzi, in una significativa percentuale di cellule infette questo stato di latenza può persistere per mesi o addirittura anni.

Pare che il fattore che determina la latenza o l'attivazione del virus sia lo stato di attivazione immunitaria della cellula infettata; l'attivazione dei linfociti T4 da parte di

antigeni o mitogeni o citochine (TNF, IL-1 ecc.) o *virus eterologhi* (HTLV-1, EBV, CMV, HBV, ecc) promuove la proliferazione virale di HIV-1.

Una piccola percentuale di molecole lineari di cDNA non subisce il processo d'integrazione e rimane nella cellula dando origine a due molecole circolari di DNA virale non integrato: l'1LTR e il 2LTR, che rappresentano i marcatori di traslocazione nucleare, oppure persiste in forma lineare nel nucleo e nel citoplasma.

6.4 Trascrizione

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

Uno degli eventi più efficaci nello stimolare la trascrizione è rappresentato, come detto in precedenza, dalle citochine prodotte dalle cellule del sistema immunitario in risposta a uno stimolo antigenico o dall'infezione concomitante di altri virus a DNA, che riescono a riattivare l'infezione latente di HIV grazie alla produzione di fattori capaci di interagire col promotore LTR.

Il genoma di HIV codifica per tre classi di mRNA di diversa lunghezza che possono originarsi grazie alla presenza di siti "accettori" di *splicing*. La prima classe consiste di mRNA di 2 Kb, risultato di eventi multipli di *splicing*, che codificano per le proteine regolatrici, la seconda di mRNA di 9 Kb non sottoposti a *splicing*, mentre la terza classe di 4-5 Kb è il prodotto di singoli eventi di *splicing* che codificano per le proteine strutturali del virione.

La prima classe di mRNA si trova nel nucleo cellulare, nelle prime fasi della replicazione virale, mentre gli mRNA per le proteine strutturali vengono prodotte in un secondo momento grazie all'azione delle proteine regolatrici.

Infatti *tat* aumenta il ritmo di trascrizione e la produzione di molecole di RNA di dimensioni maggiori, mentre l'accumulo di *rev* porta al blocco dei processi di *multi-splicing* e l'esportazione nel citoplasma degli RNA genomici e degli mRNA per le proteine strutturali ed enzimatiche, che andranno ad assemblare il virione ^[20].

6.5 Assemblaggio

Il sito di assemblaggio è diverso da virus a virus e dipende dal sito di replicazione e dal meccanismo con cui il virus sarà rilasciato. L'assemblaggio della particella virale di HIV si svolge a livello del citoplasma (come tutti i virus a RNA), dove l'aumentato livello di proteine e di genomi virali, raggiunta una concentrazione critica, dà il via al processo.

Lo stadio iniziale prevede l'associazione dei precursori proteici Gag e Gag-Pol con la porzione interna della membrana dopo la miristilazione, senza la quale i precursori del capsid rimangono nel citoplasma, impedendo il rilascio delle particelle.

Le proteine capsidiche si uniscono al di sotto della faccia interna della membrana, dove si trovano inserite la gp120, gp41 e p17.

E' il precursore gag p55 l'elemento centrale dell'assemblaggio della particella e il gene da cui derivano importanti proteine che si trovano nel virione, quali MA, CA, NC e p6, anche se pare che solo le prime due siano indispensabili come forza trainante questo processo. Anche il piccolo peptide p2, situato tra CA e NC, pare avere un ruolo, poiché mutazioni in esso determinano un errato assemblaggio. Anche alcune proteine regolatrici sono coinvolte attivamente: Vif aumenta la capacità di infezione del virione, mentre Vpu incrementa la velocità di montaggio e accelera il rilascio delle particelle dalla membrana.

6.6 Maturazione e gemmazione

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

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

Esse sono enzimi che riconoscono specificamente una determinata sequenza aminoacidica o una particolare conformazione e vengono attivate solo quando entrano in contatto con la loro sequenza target.

Il passaggio finale è il rilascio del virione dalla cellula ospite, processo che avviene per gemmazione dalla membrana cellulare, precedentemente modificata per l'inserimento delle proteine codificate dal gene *env*, attraverso la quale i virus acquisiscono l'*envelope* lipidico^[21].

Il rilascio del virione può danneggiare irreversibilmente le cellule, ma generalmente è compatibile con la loro sopravvivenza. Il destino delle cellule dipende dal grado di recettore CD4 da esse espresso; infatti i linfociti T helper, che possiedono grandi quantità di CD4, liberano molti virioni e vanno incontro a morte per lisi cellulare, mentre i macrofagi e le cellule dendritiche, che esprimono CD4 in quantità molto minore, liberano pochi virioni e generalmente sopravvivono. Ciò è molto importante per comprendere il ruolo di riserva virale svolto da queste cellule.

7.0 LA VARIABILITA' GENETICA

Una caratteristica del virus HIV-1 è la sua grande variabilità, dimostrata confrontando diversi stipiti virali, isolati in soggetti diversi o in diversi stadi dell'infezione di uno stesso soggetto. Questa elevata variabilità genetica e fenotipica deriva dal fatto che l'informazione genetica subisce una serie di passaggi che comportano un alto numero di errori di trascrizione, soprattutto perché la trascrittasi inversa non possiede un meccanismo di correzione di bozze, perciò gli errori che l'enzima commette si traducono in un cospicuo numero di mutazioni nel genoma della progenie virale. In questo modo perciò si creano stipiti virali con diverse caratteristiche a seconda della mutazione subita.

Le sequenze maggiormente soggette a variazioni sono quelle dei geni *env* e *nef*, le più conservate quelle di *gag* e *pol* che subiscono per lo più mutazioni silenti in terza base. Le mutazioni di *env* possono essere delezioni, inserzioni, duplicazioni o mutazioni puntiformi in prima o seconda base e tutte queste mutazioni sono utili al virus per non essere riconosciuto dal sistema immunitario ed eluderne così la sorveglianza.

La probabilità che avvenga una mutazione vantaggiosa aumenta anche per l'alta velocità di replicazione del virus. Mano a mano che l'infezione progredisce perciò ci si allontana sempre più dal genoma del virus di partenza.

Le glicoproteine di superficie, come detto, sono spesso soggette a mutazioni, ma contengono comunque delle regioni conservate; in particolare gp120 contiene sequenze aminoacidiche costanti (C1-C4) intercalate a regioni ipervariabili (V1-V5). Questa variabilità nelle proteine di superficie fa sì che un anticorpo, efficace nei confronti di un virus, non lo sia per nulla per altri stipiti virali derivati da mutazioni successive e ciò è l'elemento che più di tutti rende difficoltoso l'allestimento di un vaccino efficace. La grande variabilità di questo virus è inoltre causa delle numerose resistenze che si vengono a creare nel corso della terapia farmacologica ^[22].

La diversità genetica si può riflettere anche in caratteri fenotipici importanti per determinare il corso dell'infezione. Uno di questi è la capacità del virus di replicarsi in diversi tipi di cellule (tropismo), in base alla quale si distinguono stipiti linfotropi e macrofagotropi. Altri caratteri sono la crescita rapida, associata ad elevata capacità sinciziogena (stipiti "rapid/high"), o la crescita lenta (stipiti "slow/slow").

Sulla base delle differenze riscontrate, HIV-1 viene suddiviso in 8 sottotipi, filogeneticamente distinti, con un progenitore comune:

- A e D sono per lo più in Africa Centrale,
- B negli USA e in Europa Occidentale,
- C in Africa Orientale, Sud Africa e India,
- F in Brasile e Romania,
- G e H in Africa Centrale e Russia,
- I a Cipro.
- In Gabon e Camerun poi identificato un sottotipo O (“outliers”), così diverso dagli altri da essere inutilizzabile per fini diagnostici.

8.0 MODALITA' DI TRASMISSIONE DI HIV

L'esatta conoscenza delle modalità di trasmissione del virus dell'immunodeficienza è fondamentale per la prevenzione di una malattia contro la quale non esistono attualmente vaccini e che non si riesce a curare definitivamente.

Le vie di trasmissione principali sono tre:

- 1) Via ematica (trasfusioni di sangue, uso di siringhe infette)
- 2) Via sessuale
- 3) Via verticale (dalla madre al bambino durante la gravidanza, al momento del parto o dopo la nascita).

1) Sangue ed emoderivati

L'infezione da HIV può avvenire sia attraverso trasfusione di sangue intero, sia tramite infusione di emoderivati (ad esempio plasma, fattori della coagulazione, concentrati di cellule), utilizzati a scopo terapeutico.

La probabilità di trasmissione è molto alta (66-100%).

Un tempo si usava anche in Italia "importare" il sangue per le trasfusioni da Paesi del Terzo Mondo, dove il virus è estremamente diffuso; ciò ha portato ad una rapida espansione dell'epidemia.

Ma dopo la metà degli anni '80 sono state introdotte misure preventive nei Paesi industrializzati: screening delle unità di sangue, procedure di autoesclusione dei donatori a rischio e appositi trattamenti sui componenti del sangue. Grazie a queste procedure, oggi il rischio di trasmissione per via ematica è praticamente nullo.

Una minima possibilità che si verifichi ugualmente il contagio è rappresentata da un eventuale donatore che si trovi nel "periodo finestra", e che risulti dunque falsamente sieronegativo ai test di controllo: in questo caso il rischio di trasmissione è del 100%. Per ridurre tale rischio, si può ricorrere talvolta a metodiche più sensibili di quelle sierologiche, come la ricerca di antigeni virali (ad esempio la proteina p24) o le tecniche di biologia molecolare (PCR).

Attualmente, le cifre dicono che i casi d'infezione da HIV attraverso trasfusioni di sangue sono di 1/200000 per i donatori occasionali e 1/600000 per i donatori periodici. Per quanto

riguarda gli emoderivati, il rischio è stato abbattuto con l'introduzione di trattamenti di separazione e purificazione.

Contatti con sangue infetto possono inoltre verificarsi negli scambi di siringhe tra tossicodipendenti o nell'uso in comune con persone infette di oggetti che possono causare piccole ferite sulla pelle (rasoi, spazzolini, ecc.).

2) Rapporti sessuali

Il virus HIV può trasmettersi durante il rapporto sessuale, a causa di piccolissime lesioni dei genitali che si verificano nel corso del rapporto stesso. Per alcuni studiosi, malattie a trasmissione sessuale concomitanti (come la sifilide, la gonorrea e altre) aumentano la probabilità di trasmissione dell'infezione alla donna.

Fino a qualche anno fa si pensava che il virus avesse maggior prevalenza nel sesso femminile, ma studi successivi sulla popolazione dell'Africa Centrale e sulle secrezioni vaginali e cervicali hanno dimostrato che la trasmissione avviene nei due sensi e con la stessa efficienza.

3) Da madre a feto

La trasmissione dalla madre al feto può avvenire in tre momenti diversi: durante la gravidanza, durante il parto o tramite l'allattamento.

Una donna sieropositiva ha una probabilità compresa tra il 10 ed il 40% di avere un figlio infetto. Poiché è impossibile prevedere se vi sarà o meno infezione, occorre in questi casi informare la madre sull'elevato rischio che corre il nascituro e sulla possibilità di prevenire la trasmissione grazie ad una terapia a base di farmaci.

È stato scoperto che somministrando la zidovudina alla madre durante la gravidanza e al neonato per le prime sei settimane di vita, il rischio di infezione scende sotto il 10%.

Il bambino dovrà poi sottoporsi a controlli nei primi due anni di vita per stabilire se vi è stato contagio o meno.

8.1 Rischio di infezione a seguito di inseminazione artificiale o da trapianto di organi/tessuti

Sono stati descritti da alcuni Autori anche casi di infezione da HIV in seguito a procedure di inseminazione artificiale e di trapianti di organi o tessuti espianati o donati. Vi sono a tal proposito norme specifiche che regolamentano tali situazioni.

Così, per la donazione di seme, il donatore deve prima sottoporsi ad una procedura di selezione e ad un test anti-HIV, oltre che ad esami che escludano la presenza di altri patogeni a trasmissione sessuale.

Il seme raccolto deve poi essere crioconservato per 180 giorni; trascorso questo periodo, si ripete il test al donatore per escludere il rischio del “periodo finestra” e, se esso resta negativo, si può procedere con l’inseminazione.

In rarissime circostanze, l’HIV sembra essere stato trasmesso anche da contatto prolungato con sangue infetto su aree di cute integra, da morsi e persino da contatti con sangue durante una lotta con sanguinamento.

Non esistono tuttavia prove per dimostrare l’effettiva trasmissione del virus attraverso queste vie inusuali^[2].

9.0 PATOGENESI DI HIV

L'infezione da HIV evolve, nella maggioranza dei casi, secondo un andamento che comprende tre fasi successive: l'infezione acuta, una fase di latenza clinica, la sindrome da immunodeficienza acquisita.

L'evoluzione del decorso dell'infezione può essere molto variabile, potendo essere influenzata da svariati fattori, primo tra tutti l'impiego di un'adeguata terapia antiretrovirale.

Nella maggioranza dei casi di pazienti senza presidi terapeutici tutto il processo si svolge nell'arco di 7-10 anni, traducendosi in un quadro patologico drammatico e che conduce alla morte del soggetto. A questo schema fanno eccezione i "Long-term nonprogressor", che non mostrano sintomi per molti anni e che non hanno una perdita significativa di cellule CD4+. (**Fig. 7**)

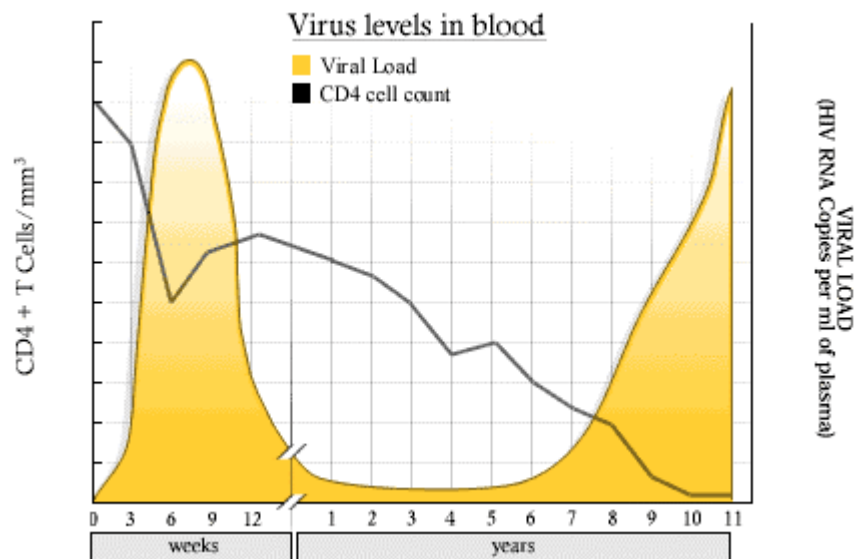


Fig. 7: Andamento della carica virale e dei CD4+ nel corso delle diverse fasi della malattia
(www.aidsinfo.nih.gov)

9.1 Infezione acuta o primaria

Il periodo immediatamente successivo al contagio, viene definito come fase iniziale dell'infezione o infezione acuta.

Dal punto di vista virologico si accompagna ad un elevato titolo di HIV nel sangue del paziente (viremia $>10^6$ virioni/ml di plasma) e ad un elevato tasso di replicazione che permette la disseminazione del virus a livello degli organi linfoidi (soprattutto nei linfonodi, ma anche in milza, tonsille e tessuto linfoide, che sono i tessuti più ricchi in linfociti CD4+). Questa disseminazione avviene ancor prima della risposta anticorpale, che si attiva alcune settimane dopo l'infezione (1 settimana-3 mesi), perciò tale intervallo è detto "periodo finestra", mentre la comparsa degli anticorpi è detta "sieroconversione".

In seguito ad un'efficace risposta immunitaria la viremia nel sangue si abbassa drasticamente; questo probabilmente non riflette un'inibizione della replicazione virale, ma piuttosto un'efficiente azione del sistema nel rimuovere le particelle virali che si sono prodotte. Durante la fase acuta si assiste inoltre ad un calo sistemico e drastico dei linfociti CD4+, che però è solo transitorio, poiché si verifica una normalizzazione dei valori una volta attivata la risposta anticorpale.

L'infezione acuta decorre spesso in modo asintomatico oppure può tradursi, entro 2-6 settimane dal contagio, in sintomi simili a quelli di una sindrome influenzale o mononucleosica: febbre, malessere, ingrossamento dei linfonodi, stanchezza, esantema orticarioide.

9.2 Latenza clinica

Lo sviluppo della risposta immunitaria specifica e la riduzione del carico virale nel sangue periferico segnano il passaggio dalla fase acuta a quella cronica, clinicamente latente, caratterizzata dalla mancanza di sintomi. A questa fase, che può durare diversi anni (dagli 8 ai 12), non corrisponde una latenza biologica, dal momento che la replicazione del virus continua negli organi linfoidi (**Fig. 8**).



Fig. 8: Compartimenti di attiva replicazione e di latenza.

(www.paginemediche.it)

Possono perciò coesistere cellule in cui è presente solo il provirus integrato e cellule in cui invece sono presenti le diverse fasi della replicazione virale.

Il sangue periferico perciò non riflette precisamente l'effettivo stato immunologico dell'intero organismo, ma sono gli organi linfoidi (soprattutto linfonodi e cellule dendritiche follicolari) la sede principale della replicazione e propagazione virale.

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

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

Una quota minore presenta un'evoluzione più rapida (*rapid progressor*) e una porzione, costituita da meno del 10% dei soggetti infetti, ha una tendenza a non ammalarsi anche dopo 12 anni di infezione. ^[23]

9.3 Fase sintomatica o AIDS conclamato

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

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

L'insorgenza di infezioni opportunistiche (fase di **AIDS conclamato**)^[24] sono la principale causa di morte; tra queste le più frequenti sono: toxoplasmosi viscerale, polmonite da *Pneumocystis carinii* (colpisce il 75% dei pazienti) e da Citomegalovirus, infezioni erpetica disseminata.

Tutte queste infezioni sono causate da microrganismi ubiquitari dell'ambiente, normalmente poco patogeni in soggetti immunocompetenti, ma capaci di indurre manifestazioni patologiche gravi in condizioni di immunodepressione.

Caratteristiche dell'AIDS conclamato sono anche affezioni neoplastiche quali il Sarcoma di Kaposi, linfomi B cellulari, linfomi e carcinomi del collo dell'utero.

Un organo in cui si assiste a una forte replicazione virale è il cervello, circa 2/3 dei pazienti affetti da AIDS presenta infatti lesioni degenerative a carico del Sistema Nervoso Centrale; il virus può infatti colpire le cellule del SNC quali macrofagi e cellule della microglia, portando a una forma di encefalopatia detta ADC (*AIDS-dementia complex*).

In conclusione la patologia dell'infezione da HIV risulta caratterizzata da una irreversibile compromissione della risposta immunitaria dovuta principalmente al calo dei linfociti T helper, che si traduce nella comparsa incontrollata di infezioni opportunistiche, manifestazioni neoplastiche, lesioni degenerative del SNC e di alterazioni emopoietiche periferiche che determinano una grave compromissione del sistema emopoietico.

Tuttavia, benché i linfociti T4 siano il bersaglio principale dell'infezione, il numero di tali cellule realmente infette si mantiene sostanzialmente esiguo rispetto alla popolazione

totale. Risulta perciò difficile comprendere l'estesa distruzione di tali cellule, considerando il fatto che esse, in condizioni fisiologiche, vengono continuamente rimpiazzate dai progenitori ematopoietici della serie linfoidi. Per spiegare questa perdita di cellule è stata presa in considerazione l'apoptosi ^[25,26], un fenomeno fisiologico selettivo che in corso di AIDS viene esasperato.

Oltre ai meccanismi patologici basati su proteine in grado di determinare la morte cellulare programmata, il virus è in grado di innescare segnali alternativi: la proteina Tat infatti, liberata nell'ambiente dalle cellule infette, amplifica il danno cellulare tramite induzione, nelle cellule non infette, di una massiva produzione di citochine, che determina uno squilibrio dei sistemi omeostatici e di controllo della proliferazione e differenziazione cellulare.

La causa delle lesioni del SNC non è da ricercare nell'infezione dei neuroni, ma sembra sia una conseguenza della liberazione di gp120 da parte delle cellule gliali accessorie, che innesca l'apoptosi dei neuroni stessi. Vari altri fattori sono stati poi chiamati in causa come possibili potenziatori dell'immunodeficienza, come infezioni da virus (HIV-2, CMV, HSV-6 e 7) o da batteri ^[27,28].

Diversamente da quanto accade nei soggetti adulti, nei neonati infetti (che rappresentano circa il 10-40% dei nati da madri sieropositive) e nei bambini il virus tende ad essere più aggressivo e l'evoluzione dell'infezione molto più rapida, portando alla morte del paziente nell'arco di 5-6 anni. A questo quadro si aggiunge poi la minor disponibilità di farmaci anti-HIV somministrabili a bambini di età inferiore a 13 anni. Per quanto riguarda il decorso clinico nei bambini il virus manifesta i suoi sintomi fin dal primo anno di vita, esso infatti infetta frequentemente il cervello ancora in maturazione, ostacolando lo sviluppo intellettuale, le funzioni motorie e causando problemi di coordinazione. Si possono avere inoltre disturbi nella crescita e una maggior suscettibilità alle infezioni batteriche, essendo il sistema immunitario del bambino non ancora pienamente formato e depresso, allo stesso tempo, dall'infezione virale. La maggior aggressività del virus nei bambini sembra essere in relazione alla costante ed elevata carica virale, che non subisce la diminuzione tipica dell'adulto; l'evoluzione della malattia risulta perciò più rapida e correlata a una ridotta sopravvivenza.

10.0 LA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA HIV

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

Lo schema generale del protocollo diagnostico prevede dapprima il test per lo screening di base, costituito dalla ricerca di anticorpi anti-HIV nel siero mediante saggio immunoenzimatico **ELISA (Fig. 9)**, in cui gli antigeni virali (lisato virale, peptici ricombinanti gag ed env e/o peptici sintetici codificati dal gene env) sono adesi su fase solida. Attualmente sono disponibili saggi ELISA di quarta generazione che combinano la ricerca degli antigeni virali a quella degli anticorpi, riducendo così il "periodo finestra".

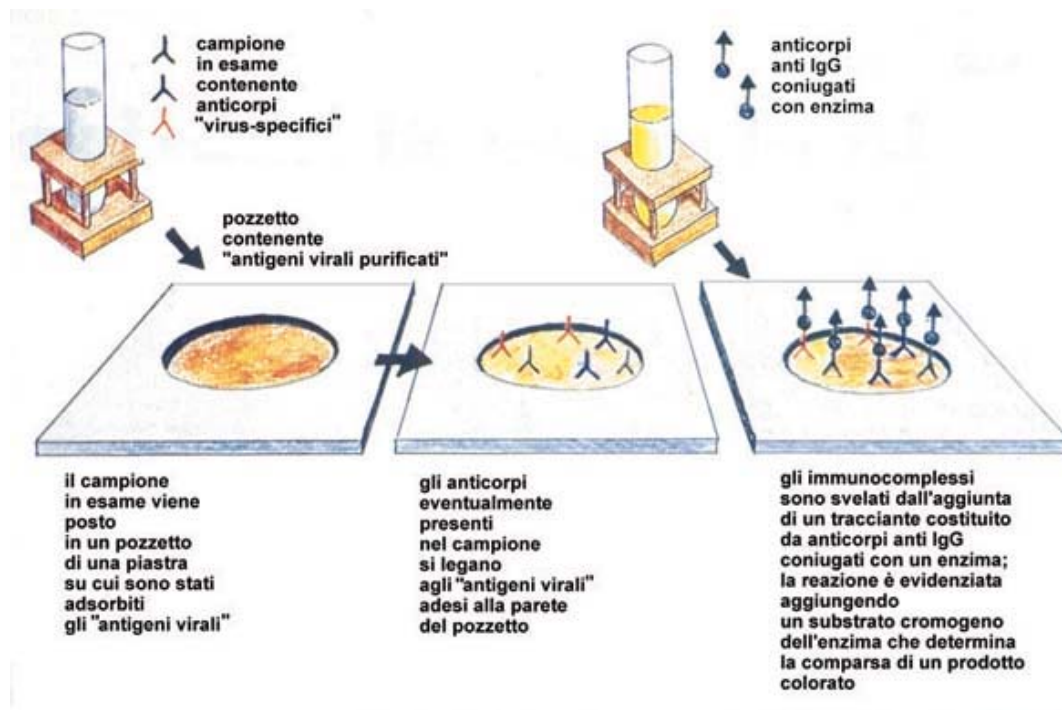


Fig. 9: Test ELISA (<http://www.cdc.gov/hiv>).

Gli anticorpi specifici per HIV possono essere rilevati entro 2-8 settimane dopo l'infezione. Il tempo necessario per osservare la **sieroconversione** dipende da diversi fattori, come la concentrazione infettante, la modalità di trasmissione e, infine, la sensibilità del test usato. La sierconversione inizia generalmente con la comparsa di IgM specifiche per la proteina Gag, poi, nell'arco di 5-7 giorni, compaiono le IgG dirette verso le proteine virali p24 e gp120, che però in questa fase sono difficilmente individuabili con i comuni saggi sierologici. Il titolo anticorpale delle IgG specifiche per le proteine di HIV aumenta progressivamente nei primi mesi, per poi stabilizzarsi raggiungendo un plateau. Campioni positivi o indeterminati con il test immunoenzimatico ELISA vengono quindi sottoposti ad un test qualitativo di secondo livello, cioè **Immunoblotting** o **Western blotting (Fig.10)**, che consente di evidenziare la presenza di anticorpi contro le singole proteine virus-specifiche, separate in base al peso molecolare. Per essere considerato positivo a questo test un campione di siero deve possedere anticorpi verso almeno una proteina del core (p24) e una dell'envelope (gp41, gp120 o gp160).

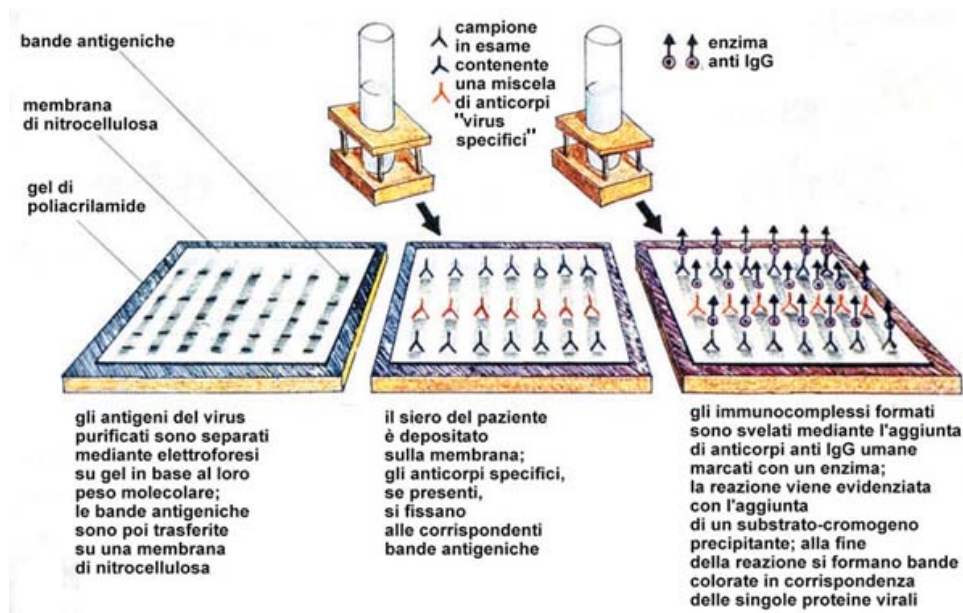


Fig.10: Western Blot (<http://www.cdc.gov/hiv>).

Nei casi di reattività verso una sola proteina virale si ha un risultato indeterminato e perciò serve un secondo controllo dopo 15-30 giorni ^[2] (**Fig. 11**).

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

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

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

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

La ricerca di p24 e dell'RNA virale nel plasma assicurano un'elevata sensibilità nella diagnosi, ma per essere certi di un'infezione in atto la ricerca del DNA provirale nei linfomonociti circolanti, attraverso metodiche di amplificazione quali la PCR, è in assoluto la metodica che dà maggior affidabilità, rilevando la presenza di virus latente nella cellula (provirus) indipendentemente dalla replicazione virale e permettendo di ottenere una diagnosi in tempi più rapidi, senza dover manipolare virus infettante^[29,30].

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

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

Nel primo mese di vita possono esserci dei falsi positivi, ma comunque già alla nascita un 38% dei bambini infetti risultano positivi alla PCR e la sensibilità della metodica aumenta, fino a raggiungere il 100% in 14-30 giorni ^[31].

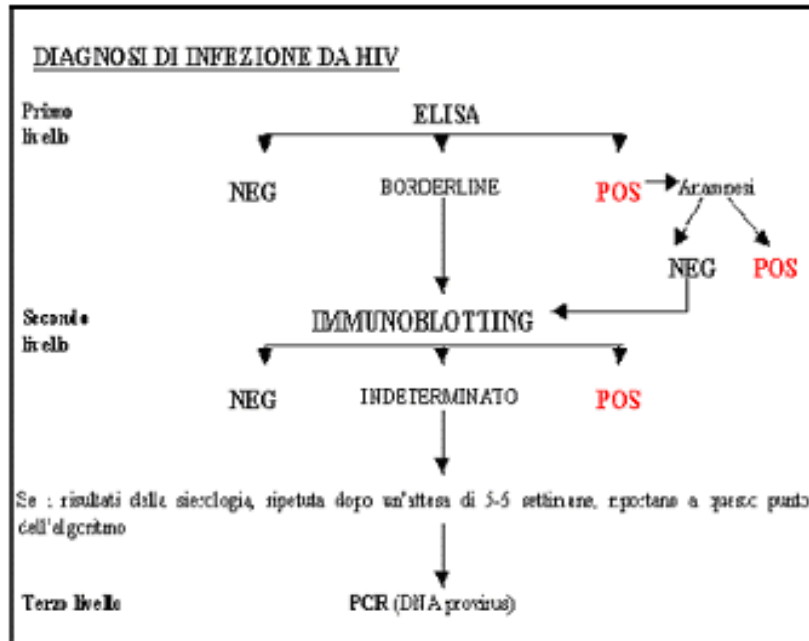


Fig. 11: Passaggi necessari per la diagnosi di infezione da HIV

10.1 Il test di avidità

Il test di avidità si basa sul concetto generale che gli anticorpi prodotti nella prima fase dell'infezione hanno, in generale, una bassa avidità per l'antigene specifico: è noto che l'avidità aumenta progressivamente nel tempo dopo il contatto con l'antigene^[32].

E' evidente quindi che i legami antigene-anticorpo che si formano nelle prime fasi dell'infezione avranno una bassa avidità, mentre i legami che si formano più tardivamente, avranno un indice elevato.

Pertanto, poiché l'indice di avidità si determina sulla base dei legami antigene-anticorpo che si vengono a formare, per introdurre questo nuovo marker nella diagnosi di infezione da HIV accanto ai comuni parametri sierologici, abbiamo utilizzato il saggio immunoenzimatico *Vironostika HIV-1 e 2 Uniform* senza apportare alcuna modifica alla metodica stessa^[33].

L'unica variazione riguarda la preparazione dei campioni che prevede l'allestimento di due aliquote differentemente trattate, l'una con l'aggiunta di PBS, l'altra con l'aggiunta di Guanidina 1M.

HIV Uni-Form II Ag/Ab è un saggio di IV generazione basato sul principio sandwich in una fase. La fase solida è costituita da una miscela di gp160 di HIV-1, di ANT70 di HIV-1, di env di HIV-2 e di anti -HIV-1 p24. Ogni pozzetto microELISA contiene una sfera di coniugato marcato con HRP, costituito dalla stessa miscela di anticorpi/antigeni di HIV.

Se nel campione sono presenti antigeni di HIV-1, si forma un complesso anticorpo legato alla fase solida/antigene HIV/anticorpo marcato con enzima.

L'aggiunta successiva di un appropriato substrato genera un segnale fluorescente che viene letto automaticamente e trasformato in un segnale numerico che viene rapportato al cut-off del test, determinato da una calibrazione.

Il saggio è quindi interamente automatico e fornisce un risultato qualitativo basato sul **rapporto campione/cut-off (S/CO)**.

La guanidina è noto essere un agente denaturante e quindi agisce eluendo i legami antigene-anticorpo a bassa avidità, che sono quelli che si riscontrano nei primi mesi dell'infezione.

Pertanto, nei campioni con bassa avidità anticorpale, il rapporto S/CO nella aliquota con la guanidina risulterà più basso rispetto a quella diluita con il PBS.

Dopo aver ottenuto questi due rapporti, l'indice di avidità (AI) è calcolato secondo la seguente formula:

$$\text{AI} = \frac{\text{Rapporto S/CO dell'aliquota con G}}{\text{Rapporto S/CO dell'aliquota con PBS}}$$

Questo può essere utile per riuscire a discriminare i campioni con infezione recente da una pregressa o una eventuale riattivazione, soprattutto nei pazienti la cui data di sieroconversione non sia stata mai accertata, così da far ritenere che la determinazione dell'**indice di avidità (AI)** possa divenire un utile marker prognostico.

I dati che abbiamo ottenuto ci hanno permesso di identificare il valore soglia dell'indice di avidità cioè quel valore in grado di discriminare una infezione recente da una pregressa .

Pertanto un valore dell'AI <0.8 O.D. permette di classificare una infezione come recente (<6 mesi), mentre per valori dell'AI >0.8 O.D. una infezione si può ritenere pregressa (>6mesi-più di un anno).

Infine, vale la pena sottolineare che anche i costi, estremamente contenuti, la semplicità del metodo, i tempi di esecuzione rapida, suggeriscono la possibilità di utilizzare questa metodica insieme ai comuni metodi di indagini sierologiche per una diagnosi precoce di infezione da HIV-1.

11.0 LA TERAPIA FARMACOLOGICA

Fino a qualche tempo fa l'intervento medico nella terapia dell'infezione da HIV-1 si limitava al controllo e alla cura delle infezioni opportunistiche che insorgono come conseguenza della malattia. Negli ultimi anni sono stati fatti enormi passi avanti e questo tipo di trattamento è stato completamente sostituito, grazie all'introduzione di farmaci antiretrovirali.

La miglior comprensione della patogenesi dei danni prodotti dal virus, la possibilità di determinare la carica virale e di avere perciò un parametro diretto dell'effettiva replicazione virale e la disponibilità di nuovi farmaci a potente attività antiretrovirale, ha spostato l'attenzione medica da un ambito di tipo preventivo verso la ricerca di combinazioni terapeutiche a scopo "curativo", il più possibile efficaci e al tempo stesso tollerabili dal paziente. Oggi perciò lo scopo primario della terapia è abbassare la carica virale quando il sistema immunitario è ancora efficiente e quindi in grado di recuperare pienamente le sue funzioni. Poiché il virus dipende per la sua replicazione dal macchinario biologico della cellula ospite, i farmaci antiretrovirali devono inibire selettivamente la replicazione virale senza danneggiare il metabolismo cellulare.

Gli studi di virologia molecolare hanno permesso di identificare funzioni virali specifiche: l'attacco del virus alla cellula target, la trascrizione inversa del genoma virale, la traduzione delle proteine e successivo assemblaggio e maturazione della progenie virale, che possono servire da veri bersagli per l'inibizione. Tuttavia risulta difficile sviluppare agenti antivirali in grado di distinguere i processi replicativi del virus da quelli della cellula ospite.

Attualmente sono registrati in Italia farmaci antiretrovirali appartenenti a tre classi farmacologiche, ognuna con un diverso meccanismo d'azione ^[34,35].

Tutti questi farmaci non sono in grado di uccidere il virus, ma solo di bloccarne la replicazione, perciò i pazienti in trattamento, anche se hanno una carica virale non rilevabile nel sangue, devono comunque considerarsi sempre potenzialmente infettanti.

Qualsiasi decisione sull'inizio o il cambiamento di terapia dovrebbe essere guidata dal continuo monitoraggio di parametri quali la carica virale e il numero di CD4+.

Analoghi Nucleosidici della Trascrittasi Inversa (NRTI): I più noti sono la *zidovudina* (AZT), la *didanosina* (DDI), la *zalcitabina* (DDC), la *lamivudina* (3TC), la *stavudina* (D4T) e l'*abacavir*. Per i primi dieci anni dalla scoperta del virus, questi farmaci sono stati i più usati in terapia. Sono detti nucleosidici per la loro somiglianza strutturale coi nucleosidi trifosfati.

Agiscono nelle fasi precoci della replicazione per prevenire l'infezione delle cellule sane; dopo il loro ingresso nella cellula questi farmaci vengono fosforilati dalle chinasi cellulari e sono così convertiti nella forma trifosfato attiva e competono con il deossinucleotide naturale per il legame all'RT. Competono inoltre anche coi dideossinucleotide trifosfato per l'incorporazione nella nuova catena nascente di DNA, bloccandone in tal modo la sintesi ulteriore (sono terminatori di catena poiché manca loro l'ossidrilico in posizione 3') o alterandone la funzione.

Sicuramente il farmaco più studiato è la zidovudina, utilizzato sin dal 1987. E' l'unico in grado di passare la barriera emato-encefalica e perciò di prevenire le manifestazioni neurologiche dell'ADC (*AIDS-Dementia Complex*) e di prevenire il passaggio da madre a figlio durante la gravidanza.

Analoghi non-Nucleosidici della Trascrittasi Inversa (NNRTI): Questa classe di farmaci fu scoperta circa 10 anni fa, ma il loro sviluppo è stato ostacolato dagli scarsi risultati ottenuti in seguito all'impiego in monoterapia, per la rapida insorgenza di resistenza. I più noti sono la *nevirapina*, la *delaviridina*, l'*efavirenz*.

Questi farmaci sono inibitori non competitivi, altamente selettivi per la trascrittasi inversa. Per essere attivati non richiedono la fosforilazione e non competono con i nucleosidi trifosfato, dei quali infatti non imitano la struttura. Il meccanismo con cui riescono a bloccare la trascrittasi è di tipo allosterico: agiscono legandosi direttamente al sito attivo dell'enzima, bloccandone l'azione ed impedendo così che avvenga la formazione di DNA provirale. Hanno il vantaggio di essere privi di effetti sulle cellule ematopoietiche e di non mostrare resistenza crociata con gli inibitori nucleosidici dell'RT.

Inibitori della Proteasi (PI): A differenza delle classi precedenti che lavorano in una fase precoce del ciclo replicativo, questi farmaci inibiscono la proteasi virale, che è indispensabile in uno stadio tardivo del ciclo per scindere i precursori proteici in proteine virali mature.

Questi farmaci sono composti a basso peso molecolare che interagiscono stericamente col sito attivo dell'enzima, situato all'interfaccia delle due subunità identiche che lo compongono e sono tutti composti altamente idrofobici, proprio per poter interagire col sito catalitico della proteasi, inibendone reversibilmente l'attività.

Poiché l'azione enzimatica della proteasi si esplica attraverso il processamento dei precursori della retrotrascrittasi, della integrasi e della proteina Gag e che solo le forme processate di queste proteine sono utilizzate per la costruzione di particelle virali infettanti, si deduce che questi farmaci determinano la produzione di particelle virioniche difettive, incapaci di infettare nuove cellule.

Fanno parte degli inibitori della proteasi il *saquinavir*, il *ritonavir*, l'*indinavir*, il *nelfinavir* e l'*amprenavir*.

Recentemente si è pensato di intervenire impedendo l'ingresso del retrovirus nella cellula, andando ad agire nella fase in cui HIV si lega alla cellula che andrà ad infettare^[36].

E' stata dunque introdotta una nuova categoria di farmaci, gli **inibitori della fusione**, a cui appartiene T-20 (*enfuvirtide*), un peptide di sintesi derivato dalla proteina virale transmembrana gp41. Esso è in grado di legarsi alla glicoproteina gp41, impedendone il legame del virus con la cellula bersaglio e quindi bloccandone l'ingresso.

11.1 Il fallimento terapeutico

Ogni farmaco porta alla selezione di mutanti virali resistenti e ciò è la causa principale dell'insuccesso terapeutico e l'ostacolo maggiore all'impiego del composto per trattamenti protratti di un'infezione virale a lungo decorso.

Poiché le mutazioni compaiono durante la replicazione, la loro insorgenza è la diretta conseguenza di un'incompleta soppressione dell'attività virale che si verifica o per una scorretta assunzione del farmaco o per inadeguatezza della terapia stessa.

Per ridurre il rischio dell'insorgere di resistenze è necessario ottimizzare l'aderenza del paziente alla terapia e utilizzare più farmaci in combinazione tra loro, ma è comunque documentato un fallimento terapeutico, nel primo anno di cura, nel 50% dei pazienti che iniziano la terapia antiretrovirale^[37].

L'uso di cocktail di farmaci, di solito due analoghi dei nucleosidici e non nucleosidici e un inibitore della proteasi, oltre a rallentare lo sviluppo di farmacoresistenza, sembra in grado di ridurre la tossicità cronica del farmaco, poiché permette di ottenere lo stesso effetto con dosaggi inferiori dello stesso.

Per ritardare l'insorgenza di mutazioni ci si basa sul fatto che in presenza di due farmaci la frequenza mutazionale per ciascuno non varia, ma diminuisce in modo esponenziale la possibilità di selezionare varianti con mutazioni resistenti per entrambi.

Se un farmaco non è abbastanza potente o se è assunto in concentrazione troppo bassa, il ceppo selvaggio del virus resta prevalente nell'organismo e la carica virale elevata, senza comparsa di ceppi resistenti. Molto importante è anche l'aderenza del paziente alla terapia; attualmente si ricorre a diverse assunzioni giornaliere con un preciso schema di somministrazione.

I farmaci hanno numerosi effetti collaterali quali eritema, cefalea, nausea, anemia, insensibilità agli arti inferiori etc., che spesso portano a un'interruzione del trattamento, indipendentemente dai benefici clinici ottenuti^[38].

Una terapia è tanto più efficace quanto più essa è in grado di agire sui *reservoir* anatomici, dove vi è molte volte una diversa percentuale di mutazioni, e sui *reservoir* cellulari costituiti dai macrofagi, in cui il virus si replica persistentemente ed è protetto da fattori immunologici e farmacologici.

11.2 La Farmacoresistenza

La resistenza farmacologica si instaura a seguito di mutazioni nel genoma del virus, in particolar modo a livello del gene *pol*, bersaglio preferenziale dei più noti farmaci antiretrovirali.

Tali mutazioni, in genere puntiformi, sono particolarmente frequenti durante la replicazione del virus, mentre alcune però sono compatibili con l'infettività del virus stesso (mutazioni silenziose in terza base), altre, che intervengono in punti critici quali i geni per proteine strutturali, regolatrici o enzimatiche, fanno sì che vengano così codificate proteine che svolgono ancora la loro funzione nel ciclo replicativo del virus, ma con un'affinità molto minore per il farmaco.

Il numero di mutazioni necessarie per conferire farmacoresistenza è variabile e, in alcuni casi, il tipo e la sequenza di mutazione possono essere più importanti del numero stesso. La frequente variabilità di HIV-1 costituisce perciò il principale fattore per l'emergere di varianti resistenti, in risposta alla pressione selettiva farmaco-indotta.

Durante la replicazione del genoma virale intervengono infatti tre sistemi enzimatici: trascrittasi inversa (virale), DNA polimerasi ed RNA polimerasi (cellulari), che compiono errori di copiatura tali da permettere al virus di superare gli ostacoli posti dalla pressione selettiva. Inoltre la trascrizione inversa non possiede l'attività di "proof-reading" e "correzione di bozze" ed è perciò più frequente l'incorporazione di basi errate, aumentando così la facilità nell'instaurarsi di mutazioni. Si calcola che, *in vitro*, la frequenza di errore dell'RT è di una base su 10^4 sintetizzate^[39].

Le mutazioni in punti critici come quelli sopra citati possono perciò incidere in modo drammatico sulla virulenza, la capacità di replicazione, la citotossicità e la risposta alla terapia antiretrovirale^[40].

Durante le prime fasi dell'infezione, la popolazione virale sembra essere monoclonale, con sequenze nucleotidiche relativamente *omogenee*. In seguito, durante il corso della malattia, essa appare invece *disomogenea*, fino a raggiungere un milione di varianti nel soggetto asintomatico e più di 100 milioni di varianti nel paziente in fase avanzata^[42].

La popolazione virale è perciò costituita da una specie dominante (wild type) con la miglior fitness riproduttiva, e molte piccole popolazioni distinte geneticamente e

deficitarie dal punto di vista replicativo, che rimangono di proporzioni ridotte fino a che non viene attivata una pressione selettiva operata dai farmaci.

La terapia farmacologica crea perciò una situazione dinamica con continua produzione di varianti che diventeranno nel tempo la specie dominante con conseguente selezione di ceppi resistenti ai farmaci utilizzati ^[41].

Un virus così mutato può infettare le cellule T attivate ed essere replicazione competente, oppure può integrarsi come provirus e restare latente per lungo tempo.

La mancata rilevazione di mutazioni nell'RNA plasmatico quindi non è sufficiente per escludere la presenza di esse nel provirus.

La farmacoresistenza viene dunque definita come:

- a) la perdita della sensibilità del virus all'effetto del farmaco;
- b) la comparsa di un fenotipo peculiare di HIV;
- c) il risultato di un'alterazione del genotipo;
- d) la causa primaria del fallimento terapeutico.

E' dunque necessario un controllo periodico della sensibilità/resistenza del soggetto in terapia verso le diverse classi di farmaci disponibili, per instaurare un adeguato regime terapeutico ^[42,43,44].

La farmaco-resistenza è causata da un fenotipo virale che rappresenta il risultato di un genotipo virale alterato, perciò l'analisi della sensibilità/resistenza nei confronti delle diverse classi di farmaci è possibile sia con metodi fenotipici, sia con metodi genotipici.

Determinazione fenotipica della resistenza: consiste nel determinare la capacità del virus isolato dal paziente di moltiplicarsi in colture di cellule *in vitro*, mantenute con dosi adeguate del farmaco da saggiare.

Questi test sono interpretabili facilmente e con sicurezza, infatti se c'è moltiplicazione del virus nella coltura in presenza di farmaco si deduce che esso sia resistente (o almeno una quota apprezzabile della popolazione virale lo sia), mentre se non si osserva moltiplicazione è chiaro che la popolazione virale infettante è omogeneamente sensibile.

Questo tipo di test però richiede laboratori attrezzati per isolare e coltivare HIV in colture di cellule *in vitro*, l'esecuzione è complessa, i tempi sono lunghi e i costi elevati ^[45].

Determinazione genotipica della resistenza: consiste nella ricerca diretta nel genoma virale, amplificato dal materiale patologico, di mutazioni correlate a farmaco-resistenza (ad oggi ne sono note almeno 100), identificate per confronto con una sequenza virale nota *wild-type*.

Questo tipo di test prescinde dall'impiego di colture cellulari, è relativamente poco costoso e i tempi necessari per ottenere una risposta utile molto più brevi (3-5 giorni) di quelli dei test fenotipici.

Per entrambi i tipi di test i livelli di sensibilità non sono estremamente elevati, infatti ambedue evidenziano la presenza di subset di virus portatori di mutazioni associate a farmaco-resistenza solo se presenti in almeno il 20% della popolazione virale in osservazione; inoltre sono efficienti partendo da una carica virale di almeno 1000 copie/ml di RNA.^[46]

Nonostante queste limitazioni lo studio delle farmaco-resistenze della popolazione virale presente nel paziente è uno degli esami essenziali da effettuare prima di iniziare o di modificare un trattamento farmacologico, al fine di limitare al massimo i possibili rischi di insuccesso terapeutico^[47,48].

12.0 IL FOLLOW-UP DEL PAZIENTE INFETTO

Per un paziente infetto, nel quale perciò l'infezione è stata definitivamente accertata, il problema non è più stabilire o meno la presenza del virus, ma effettuare un corretto *follow-up* del soggetto in esame, ovvero accertare il livello della replicazione virale, misurando la quantità di virus presente nell'organismo (il cosiddetto “*viral load*” o “carica virale”).

I parametri virologici che danno utili indicazioni sul “*viral load*” sono:

- Determinazione della quantità di virus infettante nel sangue periferico (ICD, *Infectious Colture Dose*) misurata in colture cellulari *in vitro*. Tecnica però indaginosa, che necessita di laboratori attrezzati e in certi casi non sufficientemente sensibile.
- Determinazione dei livelli plasmatici di antigeni virus-specifici, quali la proteina p24 del capsido (antigenemia). Questa metodica è sufficientemente sensibile e ben correlata all'intensità della replicazione, ma è ormai superata.
- Determinazione quantitativa di RNA virionico nel plasma
- Determinazione quantitativa del DNA provirale mediante PCR.

Benché i singoli criteri di valutazione del *viral load* siano in qualche modo limitati relativamente a significatività e applicabilità nelle varie fasi evolutive dell'infezione, essi sono tutti correlati in modo abbastanza soddisfacente tra loro e con la progressione e la gravità della malattia ^[49].

12.1 La Carica Virale

Nel *follow-up* del paziente infetto uno dei parametri più importanti che vengono tenuti in considerazione per un corretto monitoraggio dell'andamento dell'infezione e dell'efficacia della terapia è la **carica virale** o “**viral load**”, ovvero la quantità di virioni presenti nel sangue circolante. La determinazione del numero di copie di HIV-1 RNA/ml di plasma offre perciò una misura diretta dell'attività replicativa del virus^[50] e rappresenta un importante marker prognostico da considerare, insieme al numero di linfociti T CD4+ e all'eventuale presenza di infezione sintomatica, per la scelta della terapia farmacologica da intraprendere e il suo monitoraggio nel tempo.

Nell'infezione primaria dell'adulto il numero di copie di RNA virale raggiunge in breve tempo un picco elevato, per poi calare fino a stabilizzarsi dopo circa 6-12 mesi dal contagio, una volta che il sistema immunitario è riuscito ad arginare la replicazione virale. All'opposto nei bambini infetti la “*viral load*”, bassa alla nascita, aumenta fino a raggiungere un picco intorno ai 2 mesi di vita, per poi diminuire molto lentamente^[51].

Un altro aspetto molto importante da considerare è la correlazione tra livelli di RNA virale nel plasma e l'andamento della malattia, infatti il numero di copie di RNA nei pazienti con infezione sintomatica è di molto superiore rispetto a quello rilevabile in soggetti asintomatici.

Inoltre, i pazienti con alta carica virale e basso numero di linfociti T CD4+ presentano un rischio maggiore di rapida progressione (pochi anni) verso la fase di AIDS conclamato. Pazienti con carica virale >100.000 copie/ml entro 6 mesi dalla sierconversione hanno una probabilità 10 volte maggiore di sviluppare la malattia nei 5 anni seguenti^[52].

Diverse sono le metodiche utilizzate per questo tipo di analisi, alcune si basano sull'amplificazione della sequenza target (RT-PCR, NASBA), altre sull'amplificazione del segnale (b-DNA).

RT-PCR: differisce dalla PCR classica poiché prevede un'iniziale retrotrascrizione dell'RNA virale a cDNA, ad opera dell'enzima Trascrittasi Inversa. Si forma così una molecola che fa da stampo per la polimerasi termostabile.

Dopo la formazione del DNA bcatenario la PCR procede normalmente e si susseguono le tre fasi tipiche: denaturazione (a 95°), annealing (a 50°), estensione (con l'utilizzo degli

stessi primer necessari per la retrotrascrizione). Il primo ciclo di PCR porta alla formazione di quattro filamenti, il cui numero aumenta in maniera esponenziale nei cicli successivi, per un massimo di circa 30 cicli totali.

Per rivelare l'avvenuta amplificazione si aggiungono sonde marcate con fosfatasi alcalina e un substrato cromogeno che lega l'enzima e permette di distinguere una reazione colorimetrica, la cui intensità è proporzionale al numero di copie amplificate; è possibile fare questa valutazione grazie a una lettura allo spettrofotometro.

NASBA: questa metodica permette di effettuare un'amplificazione isotermica (41°C) attraverso l'utilizzo di tre enzimi: trascrittasi inversa, RNA polimerasi DNA-dipendente e una ribonucleasi.

Dopo aver isolato la molecola di RNA genomico, si aggiunge un primo primer modificato, poiché costituito da due parti, una complementare a una corta sequenza di RNA, l'altra che non riconosce nulla e fuoriesce come una "coda".

La trascrittasi inversa si lega al primer e forma un filamento di DNA, si ottengono così degli ibridi DNA-RNA che sono riconosciuti dalla ribonucleasi, la cui funzione è quella di digerire l'RNA. Sul DNA rimasto sono presenti i siti per l'attacco del primer 2 che fa da innesco sempre per la trascrittasi inversa che sintetizza il filamento ad esso complementare comprendendo anche la coda di primer 1. Quest'ultima, infine, è l'innesco per la RNA polimerasi DNA dipendente, che fabbrica tanti filamenti di RNA complementari all'originale.

E' ora noto un nuovo test associato al NASBA, costituito da una Real Time PCR con utilizzo di sonde *Molecular Beacons* (MB) come sistema di rivelazione. La tecnica si chiama *NucliSens* e prevede che tutte le reazioni avvengano in una singola provetta, permettendo la quantificazione dell'RNA virale.

Le *Molecular Beacons* rappresentano una nuova classe di sonde a DNA con una struttura "a stelo ed ansa" le cui estremità sono modificate: a una è legato un fluoroforo, all'altra un quencher magnetico.

Nel suo stato "normale" la MB è chiusa e il fluoroforo e il quencher sono così vicini l'uno all'altro che non viene emesso segnale, mentre l'ibridazione delle MB alla loro sequenza complementare determina la loro apertura e perciò la generazione di un segnale di fluorescenza, dovuto all'allontanamento delle due estremità ^[53](**Fig. 12**).

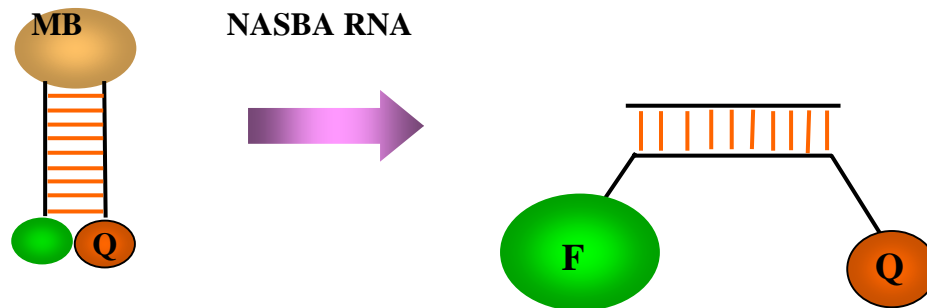


Fig. 12: Struttura delle Molecular Beacons, con fluoroforo e quencher magnetico

Durante la reazione NASBA sono aggiunte due Molecular Beacons marcate con due fluorofori diversi, la prima complementare alla sequenza bersaglio di HIV-1 e l'altra a un RNA calibratore, necessario per calcolare il numero iniziale di copie di HIV-1 RNA. Le MB ibridizzano ai rispettivi RNA e determinano perciò la generazione di un segnale fluorescente, che aumenta in relazione all'amplificazione dell'RNA

bDNA: il *Branched DNA* è una tecnica di amplificazione del segnale, un metodo a sandwich di ibridazione degli acidi nucleici. L'RNA genomico di HIV1 viene catturato sulla superficie di un micropozzetto grazie a una serie di sonde bersaglio specifiche, oligonucleotidiche e sintetiche. Il genoma è poi riconosciuto da sonde per il gene pol, contenenti sequenze aggiuntive che permettono l'ibridazione con altre sonde dette amplificatrici, che determinano un'amplificazione ramificata (da questo il nome branched). Queste sonde sono marcate con fosfatasi alcalina, perciò sono facilmente rilevate con un substrato chemiluminescente. L'emissione di luce è direttamente proporzionale alla quantità di HIV-1 RNA presente in ogni campione analizzato.

Le concentrazioni di HIV-RNA sono quindi stabilite mediante interpolazione da una curva standard generata attraverso l'emissione di luce prodotta da standard contenenti concentrazioni note del virus ^[54](**Fig. 13**).

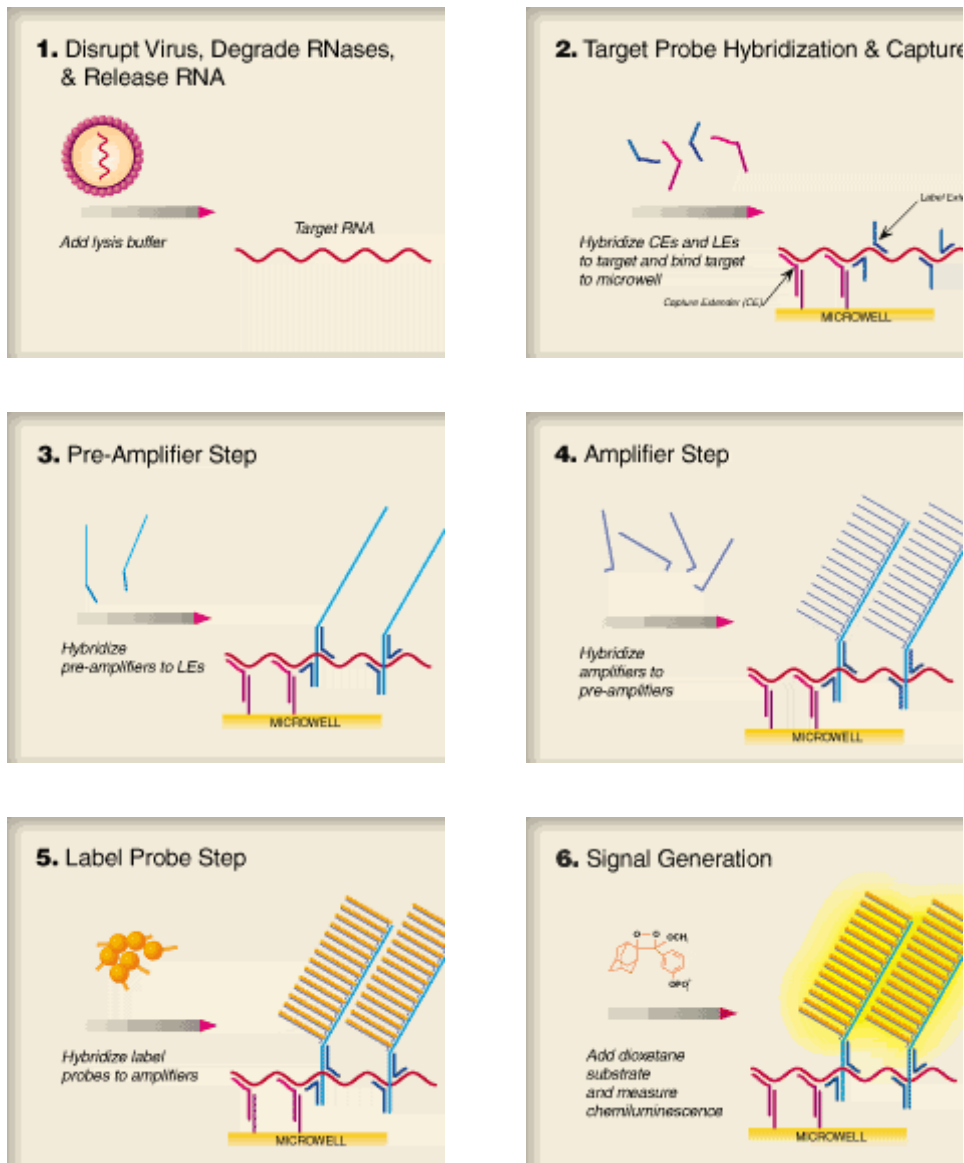


Fig. 13: I vari passaggi della metodica bDNA (Bayer HealthCare LLC, Tarrytown, NY 10591-5097 USA)

12.2 Quantificazione del DNA provirale

La DNA-PCR quantitativa è la metodica attraverso cui si misura la quantità di provirus, ovvero di virus “latente” presente nell’organismo, che rappresenta il principale ostacolo all’eradicazione dell’infezione.

Il virus dell’immunodeficienza acquisita può, infatti, persistere, sottoforma di provirus integrato in particolari distretti sia tissutali che cellulari, definiti “santuari”, che costituiscono dei veri e propri serbatoi per il virus, difficilmente penetrabili dai farmaci antiretrovirali. Da questi siti “protetti” il virus può risvegliarsi e riprendere a replicarsi.

Accanto al dosaggio dell’RNA plasmatico, quindi, si ritiene di grande importanza anche la quantificazione del DNA provirale, per avere una prognosi più sicura dell’infezione nel monitoraggio del paziente infetto. Inoltre nei pazienti aviremici la quantità di DNA provirale rappresenta l’unico parametro quantificabile.

E’ possibile fare questo tipo di valutazione grazie allo sviluppo di nuovi strumenti quali il *Light Cycler* o l’ *ABI PRISM 7700* che, attraverso un software molto delicato, permettono di programmare e gestire l’esecuzione della reazione, oltre a quantificare le copie di partenza attraverso analisi matematiche che mettono in relazione la curva ottenuta dal campione con la curva degli standard.

13.0 I RESERVOIR DI HIV

Un *reservoir* virale è un determinato tipo cellulare o sito anatomico in cui un virus, competente da un punto di vista replicativo, persiste con proprietà cinetiche più stabili rispetto al pool cellulare principale, in cui esso replica attivamente^[55].

Il virus del *reservoir*, protetto sia dall'intervento immunologico che farmacologico^[56,57], è "silente" dal punto di vista trascrizionale e stabilmente integrato; solo in seguito ad un'attivazione cellulare esso può andare incontro a replicazione e diffondersi in altri distretti cellulari.

L'isolamento di specie virali ancestrali nei vari *reservoir*, fornisce un'evidenza genetica della sua natura di "serbatoio" virale e conferma la sua stabilità^[58,59].

In corso di infezione da HIV-1 si creano due compartimenti virologici distinti, ma comunicanti:

- **compartimento attivo**, costituito dal virus libero nel sangue e da quello contenuto nei linfociti e monociti, dove il virus è attivamente replicativo ed è in grado di provocare un danno al sistema immunitario;
- **compartimento di latenza (*reservoir*)**, costituito da virus che non si replica attivamente, ma che resta in fase latente in alcuni distretti dell'organismo.

Questi compartimenti di riserva, che si formano fin dalle primissime fasi dell'infezione, sono rappresentati da alcuni organi, quali organi linfoidei, cervello, gonadi (dove ci sono barriere anatomiche che impediscono la libera circolazione delle cellule e dei farmaci, permettendo così la creazione di condizioni particolarmente favorevoli per la persistenza del virus), e da alcuni compartimenti cellulari:

1) le **cellule follicolari dendritiche** dei linfonodi (FDC), che sono in grado di trattenere sulla loro superficie esterna particelle virali che si possono mantenere infettive per lungo tempo. Esse pare abbiano un ruolo importante, soprattutto nelle prime fasi dell'infezione, per la loro funzione di presentazione dell'antigene che permette di portare il virus a contatto con gli organi linfoidei o i linfociti CD4+.

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

2) i **monociti/macrofagi** ^[69] infettati, che non vengono uccisi dal virus, il quale può pertanto continuare a replicarsi. L'emivita dei macrofagi in soggetti non infetti è circa 15

giorni. Il differenziamento dei monociti a livello del midollo osseo richiede circa due settimane, poi essi vengono liberati nel torrente circolatorio che lasciano definitivamente due giorni dopo per differenziarsi in macrofagi tissutali.

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

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

Il ruolo dei monociti è ancora controverso; sebbene sia possibile quantificare in essi il DNA di HIV-1 è difficile stimare la produzione virale da parte di queste cellule, in cui sono presenti barriere molecolari all'integrazione e alla trascrizione virale. Va dunque sottolineato come la natura stessa della popolazione monocitaria circolante non permette di definire i monociti come *reservoir* virale "a lungo termine"^[70].

3) i **linfociti T CD4+ di memoria**, che costituiscono probabilmente il più importante dei compartimenti cellulari di riserva.

In queste cellule il virus latente non è in grado di replicarsi, ma resta sempre presente con una copia del proprio genoma integrato nel DNA della cellula.

I linfociti CD4+ di memoria hanno una vita molto lunga, dato che la loro funzione biologica è proprio quella di garantire all'organismo una protezione immunitaria nei confronti di antigeni incontrati in precedenza; queste cellule, quando nel corso della loro vita incontrano l'antigene per il quale sono "programmate", ritornano alla fase attiva, durante la quale possono permettere al virus di replicarsi. In seguito, dopo diversi cicli di replicazione, molte di queste cellule andranno incontro a morte, mentre altre ritorneranno alla fase di latenza, contribuendo così al mantenimento di una stabile riserva virale. Questo *serbatoio* virale sarebbe quindi il principale responsabile della persistenza dell'infezione anche in corso di una efficace terapia antiretrovirale, rappresentando in questo modo il più importante ostacolo alla eradicazione dell'infezione. E' stato infatti dimostrato che queste cellule di memoria hanno un tempo di dimezzamento di 44 mesi, il che significa che occorrerebbero circa 73 anni prima di riuscire ad eliminarle tutte.

I linfociti CD4+ vengono sottoposti a maturazione nel timo, per poi rimanere in uno stato latente fino all'incontro con l'antigene. Si pensa che il virus possa infettare o nello stadio immaturo all'interno del timo (in quest'organo infatti esso è stato rintracciato), o nello stadio di quiescenza, una volta completata la maturazione. In tal caso si ritiene che a causa dello stato di "quiete" della cellula, il genoma virale si trovi nella **forma non integrata** o **episomiale**.

Un'altra ipotesi sostiene che HIV-1 infetti linfociti attivi i quali, una volta terminato il loro stato di attività e se sono riusciti a sopravvivere, possono andare verso uno stato di latenza. In questo caso il genoma del virus si trova nella **forma integrata**, anche se non c'è più produzione virale grazie a un cambiamento nell'espressione e localizzazione di proteine chiave dell'ospite, necessarie per l'espressione dei geni virali.

Le cellule in cui si è instaurata un'infezione latente sono protette dagli effetti citopatici virali e dai meccanismi immuni dell'ospite. Il risultato è una forma virale silente da un punto di vista trascrizionale, ma stabilmente integrata nella cellula^[57,60]. Questo processo continua durante tutta l'infezione cronica, creando un archivio virale che raccoglie tutti i periodi di replicazione virale attiva.

13.1 I *reservoir* nell'infezione primaria

Recentemente l'interesse di molti ricercatori è stato finalizzato a comprendere il rapporto farmaco/*reservoir*, al fine di chiarire se un trattamento precoce sia in grado di prevenire la formazione dei *reservoir* latenti.

E' stato confermato da diversi studi che un virus competente dal punto di vista replicativo può esser riattivato nelle cellule CD4+ quiescenti di soggetti infetti indipendentemente da quando essi abbiano iniziato la terapia o dall'arco di tempo in cui hanno avuto una carica virale non misurabile^[61,62,63].

Nel 1998 Chun *et al.*^[62], hanno verificato che in pazienti trattati precocemente durante l'infezione acuta, la frequenza di cellule quiescenti T CD4+ infettate era di 1 a 1 milione rispetto ai pazienti trattati durante l'infezione cronica.

Più recentemente questi dati sono stati confermati da uno studio su 27 pazienti, sottoposti a terapia pochi mesi dopo la sierconversione. L'analisi dell'infettività associata alle cellule, che permette una valutazione del *reservoir*, ha verificato l'assenza di DNA provirale dopo un anno di HAART nella maggior parte dei pazienti esaminati^[64]. I risultati oggi disponibili perciò suggeriscono che un trattamento precoce potrebbe limitare le dimensioni del *reservoir*, anche se teoricamente è sufficiente una singola cellula per riattivare l'infezione.

Iniziare precocemente la terapia antiretrovirale resta una decisione clinica complessa, che deve tener conto dei benefici teorici, ma anche dei ben noti rischi di tossicità, resistenza ai farmaci e costi.

13.2 I *reservoir* nell'infezione cronica

La quantificazione del DNA provirale, caratterizzante il *reservoir* cellulare, è stata al centro di molti studi effettuati su pazienti trattati farmacologicamente per un lungo periodo di tempo. Anche se non tutti gli autori sono concordi sui tempi di mancata rilevazione del DNA provirale (dai 12 ai 44 mesi) ^[65,66], diversi studi evidenziano chiaramente che la terapia, pur non eradicando completamente il virus, può comunque controllarlo sia a livello del sangue che dei distretti cellulari con funzione di *reservoir*^[67].

13.3 Implicazioni cliniche del ruolo dei *reservoir*

Sebbene la terapia possa ridurre drasticamente il carico virale plasmatico facendolo scendere al di sotto delle 50 copie/ml, attraverso le nuove tecniche di biologia molecolare, che vantano elevati livelli di sensibilità, è possibile evidenziare comunque la presenza di piccole quote di virus.

E' noto che un'interruzione di trattamento o uno switch terapeutico in pazienti trattati da più di due anni con regimi sub-ottimali, determina una "sostituzione" del virus resistente plasmatico col virus *wild type*^[71,72]. La ricomparsa del virus selvaggio, veloce e improvvisa, indica che in questa fase vi è una ricomparsa del virus "archiviato" al momento del contagio e non una reversione delle mutazioni che il virus ha acquisito.

Come il virus *wild type* perdura a livello dei serbatoi virali, così anche ceppi virali mutati, selezionati da regimi terapeutici non soppressivi, possono essere conservati a lungo; da uno studio di Lambrotte *et al.*^[73] è stata infatti confermata la coesistenza di virus *wild type* e di virus resistenti nelle cellule T CD4+, poiché le mutazioni di farmacoresistenza evolvono nel DNA episomiale, ma non nel provirus integrato.

E' dunque fondamentale considerare l'intera storia terapeutica del paziente nel momento in cui si intraprende una nuova combinazione di farmaci.

Infatti il riproporre un farmaco già utilizzato in un regime sub-ottimale può determinare una rapida riattivazione dei ceppi resistenti archiviati^[74].

Continui regimi fallimentari contribuiscono ad aumentare il numero delle mutazioni che conferiscono resistenza e soprattutto favoriscono l'espansione del *reservoir*.

PARTE SPERIMENTALE

14.0 OBIETTIVO DELLA RICERCA

E' ormai noto come i regimi terapeutici oggi disponibili siano in grado di inibire la replicazione di HIV-1 fino a valori di RNA virale nel plasma non più quantificabili, ma ciò non rappresenta una misura sicura ed assoluta di successo terapeutico con eradicazione progressiva dell'infezione. Il virus dell'HIV può, infatti, persistere, nella forma integrata, in numerosi distretti tissutali (linfonodi, cervello, organi sessuali) e cellulari (cellule della memoria immunitaria a vita lunghissima quali i linfociti CD4 *resting*) che costituiscono dei veri e propri serbatoi virali, difficilmente penetrabili dai farmaci antiretrovirali. Da questi siti "protetti" il virus può risvegliarsi e riprendere a replicarsi. Pertanto, la presenza di cellule latentemente infette, serbatoio pronto a produrre nuovo virus una volta che venga a mancare l'effetto farmacologico della terapia, ha stimolato numerosi studi sui reservoir virali e sul loro significato.

Numerosi dati, infatti, evidenziano come i livelli di DNA provirale persistano per lunghi periodi di tempo, rappresentando il *reservoir* reale dell'infezione, che continua cronicamente a dispetto delle terapie attualmente applicate. Questo *reservoir* gioca un ruolo essenziale nella patogenesi dell'infezione. La quantificazione del DNA provirale, rappresenta, pertanto, un elemento importante nel monitoraggio del paziente infetto.

Molti lavori indicano una relazione tra il livello del DNA provirale e l'esito della terapia, mettendo in evidenza una maggiore probabilità di ottenere un successo virologico e di mantenerlo a lungo nei pazienti che iniziano i diversi protocolli terapeutici quando i livelli di DNA sono modesti. Negli adulti, infatti, alti livelli di DNA sono correlati ad una progressione dell'infezione^[106]. Studi paralleli dimostrano che la presenza di un livello consistente di DNA provirale anche nei soggetti aviremici rappresenta un marker significativo sia per esplorare i *reservoir* virali sia per avere indicazioni relative all'impatto a lungo termine della terapia antiretrovirale^[90].

Molto meno numerose e stringenti sono le evidenze sul significato potenziale del DNA non integrato, la cui determinazione viene effettuata con metodi molecolari volti ad evidenziare in particolar modo la forma circolare con due LTR.

Dopo la retrotrascrizione, le molecole lineari di cDNA sintetizzate vengono traslocate nel nucleo ed una piccola percentuale di tali forme danno origine a due molecole circolari di

DNA virale non integrato: l'1LTR e il 2LTR, che rappresentano i marcatori di traslocazione nucleare. La forma lineare persiste sia nel citoplasma che nel nucleo e in seguito a stimoli di attivazione si integra nel genoma cellulare.

Il pool di HIV-1 DNA (Fig. 14) è caratterizzato, pertanto, da:

- un DNA non integrato o extracromosomico, rappresentato dalla forma lineare (cDNA lineare) e dalle due forme circolari 1LTR e 2LTR;
- il DNA integrato.

Diversi studi hanno focalizzato la loro attenzione sul significato della presenza del DNA non integrato che sembra essere la forma meno stabile rispetto al DNA integrato, il cui livello rimane piuttosto costante nel corso dell'infezione^[76]. Tale forma transitoria è stata correlata ad una infezione de novo dei linfociti T CD4, mentre una diminuzione dei livelli della forma circolare viene correlata con l'efficacia terapeutica.

Due sono le forme di latenza descritte^[86] nei linfociti T CD4 *resting* (non attivi):

- **la pre-integrazione** che si verifica quando le cellule *resting* infettate presentano il cDNA nel citoplasma ed in assenza di stimoli esterni che le attivino, non sono in grado di produrre progenie virale. Esse si trovano quindi in uno stato di quiescenza e la forma predominante di DNA è quella extracromosomica.
- **la post-integrazione** che si ha quando le cellule infettate sono attivate e quindi si verifica la traslocazione del cDNA nel nucleo e la sua integrazione nel genoma cellulare, che può rimanere trascrizionalmente silente^[87].

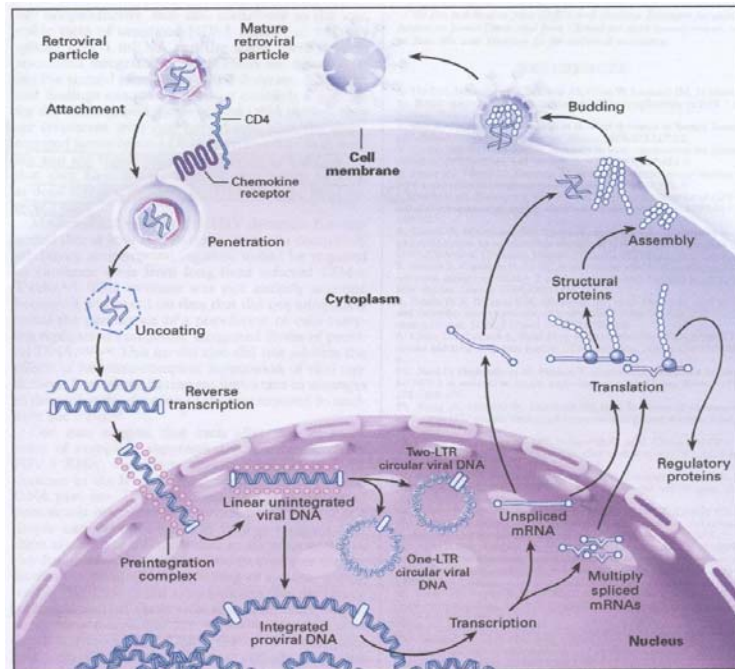


Fig. 14: Ciclo replicativo di HIV-1 che mostra la formazione delle forme circolari 1LTR e 2LTR e del provirus integrato (Clin Infect Dis. 2002)

Ulteriori studi longitudinali sono richiesti per valutare la stabilità di tali forme e per determinare se la presenza o l' assenza della forma 2LTR sia predittiva della soppressione della viremia. La valutazione del DNA non integrato 2LTR in campioni sequenziali di PBMC potrebbe, in diversi casi, fornire importanti indicazioni.

A tale proposito l'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare l'andamento di entrambi i parametri DNA totale e DNA episomiale, in un gruppo particolare di pazienti HIV-1 infetti, sottoposti a trapianto di fegato, al fine di osservare il loro andamento nel tempo in relazione al loro stato clinico, al numero dei linfociti T CD4 e alla viremia plasmatica, per poter comprendere le diverse indicazioni che questi parametri possano fornirci. In particolare abbiamo focalizzato l'attenzione sul DNA 2LTR, al fine di valutare come tale parametro possa acquisire un ruolo rilevante nel *follow-up* del paziente HIV-1 infetto.

Allo stato attuale delle conoscenze, sicuramente il trapianto d'organo in soggetti con infezione da HIV rappresenta ancora una realtà piuttosto complessa che rende

indispensabile la coesistenza, presso i centri trapianto, di competenze plurispecialistiche in grado di garantire una gestione corretta della terapia antirigetto e delle problematiche correlate all'infezione da HIV.

La valutazione quantitativa del *viral load* DNA diventa, quindi, un obiettivo di un certo interesse che può avere delle ripercussioni nella valutazione della terapia e portare ad una maggiore comprensione sull'evoluzione dell'infezione.

Nonostante l'uso diffuso delle tecniche di biologia molecolare, mancano - a tutt'oggi - metodi standardizzati per la misura del DNA provirale, almeno nelle due forme più significative, totale e non integrato. Al fine di ottenere una metodica i cui risultati possano avere un significato applicabile alla clinica, è stato creato un gruppo di lavoro (*Gruppo di Studio DNA Provirale*) che possa fornire indicazioni sia sulla metodologia sia sulla applicabilità del metodo.

14.1 Trapianto epatico nei soggetti con infezione da HIV

La realtà del paziente sieropositivo rispetto alla possibilità di un trapianto d'organo sta radicalmente cambiando. Fino a qualche anno fa l'infezione da HIV era considerata un criterio di esclusione assoluto per qualsiasi tipo di trapianto in base a varie considerazioni: 1) la breve aspettativa di vita dei soggetti con AIDS ed anche in epoca pre-HAART con infezione da HIV; 2) la presenza o il rischio elevato di contrarre patologie opportunistiche infettive e/o neoplastiche come conseguenza dell'immunodepressione da HIV; 3) la considerazione che l'immunodepressione farmacologica potesse sia aggravare l'incidenza di patologie "opportunistiche" sia accelerare la progressione clinica dell'infezione da HIV verso l'AIDS conclamato e verso il decesso^[108].

Oggi, si sta vagliando l'opportunità di eseguire trapianti d'organi grazie ai successi della terapia antiretrovirale, che hanno permesso al paziente sieropositivo di tenere sotto controllo il virus e di avere una aspettativa di vita molto più lunga.

In particolar modo il numero di persone sieropositive che necessiterebbero di un trapianto di fegato è in continuo aumento. Infatti, l'alto tasso di infezione HIV e HCV, in cui il decorso della malattia epatica appare notevolmente accelerato, ha portato ad un aumento di malattie quali cirrosi epatica ed epatocarcinoma. Le malattie epatiche da HCV e da HBV hanno una storia naturale di difficile valutazione, data la lunga fase di decorso silente prima che compaiano i segni di una epatopatia avanzata. In soggetti adulti non immunocompromessi è comunque assai raro che una epatopatia virale porti a complicanze o morte prima che siano trascorsi almeno 20 anni dalla infezione primaria. Cofattori, come ad es il consumo di alcool, possono accelerare significativamente il tempo di progressione in fibrosi. Numerosi studi mostrano, in pazienti con coinfezione HIV/HCV, una velocità di progressione in cirrosi che in media è assai più elevata rispetto ai soggetti non coinfeziti^[108-109]. Ciò si traduce in una elevata morbosità e mortalità per cirrosi nei soggetti HIV infetti. Di fatto attualmente in Italia oltre il 30% delle morti in pazienti HIV positivi è riconducibile a causa epatica (cirrosi, epatocarcinoma, epatite cronica riacutizzata). Vanno sottolineati anche i problemi relativi alla epatotossicità della HAART in presenza di una epatopatia cronica. La presenza di una

malattia epatica avanzata rappresenta sempre più spesso una controindicazione all'uso dei farmaci antiretrovirali e all'adozione di regimi HAART^[110].

La tossicità legata a questi farmaci può costituire un ulteriore cofattore di progressione della malattia epatica da HCV o HBV.

Le premesse di cui sopra hanno indotto alcuni centri europei e statunitensi a riconsiderare la possibilità del trapianto di fegato nei soggetti con infezione da HIV. Ad oggi sono stati eseguiti complessivamente, in epoca HAART, più di 50 trapianti di fegato in soggetti con infezione da HIV. Tale consistenza numerica e la relativa brevità del *“follow-up”* dei casi riportati, nonostante i risultati sin qui conseguiti risultino incoraggianti, non consentono tuttavia di fare ritenere il trapianto d'organo nei soggetti con infezione da HIV una pratica clinica consolidata. Sulla base della esperienza clinica sino ad ora limitata, il trapianto di fegato in soggetti con infezione da HIV deve essere peraltro ritenuto attività sperimentale.

Risulta pertanto evidente che, sulla base dei risultati sino ad oggi conseguiti e della breve attesa di vita dei soggetti con cirrosi ed infezione da HIV, il trapianto di fegato si pone come una concreta possibilità di sopravvivenza per soggetti altrimenti gravati da una prognosi infausta a breve termine^[108].

La Commissione Nazionale AIDS e la Commissione Nazionale Trapianti hanno elaborato un protocollo che autorizza, in via sperimentale, i trapianti di fegato nelle persone sieropositive.

Tale programma, che si propone di allungare sino a cinque anni il tempo di osservazione, consentirà inoltre di stabilire, sulla base dei risultati conseguiti, la reale opportunità di proseguire con il trapianto di fegato nei soggetti con infezione da HIV.

15.0 MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 6 soggetti HIV-1 positivi sottoposti a trapianto di fegato, provenienti dal Dipartimento di malattie infettive dell'Ospedale S.Orsola-Malpighi di Bologna, inclusi nel protocollo sperimentale del Centro Nazionale Trapianti.

Sono stati definiti dei criteri aggiuntivi per l'inclusione^[108] dei pazienti HIV-1 positivi, oltre a quelli generali previsti per il trapianto e vigenti presso i singoli centri che comprendono:

- infezione da HIV documentata
- capacità di fornire/acquisire il Consenso informato
- pazienti mai trattati con terapia antiretrovirale con conta di linfociti CD4+ circolanti, stabilmente $\geq 200/\text{mmc}$;
- pazienti in terapia antiretrovirale con conta dei linfociti CD4+ $\geq 200/\text{mmc}$ stabile da almeno 12 mesi e HIV-1- RNA undetectable al momento dell'inclusione in lista;
- pazienti con malattia epatica scompensata e, per tale motivo, intolleranti a precedente terapia antiretrovirale, con conta dei linfociti CD4 $\geq 100/\text{mmc}$ e documentata risposta alla terapia antiretrovirale nell'ultimo ciclo terapeutico;
- compliance al trattamento antiretrovirale ed alla profilassi delle infezioni opportunistiche, se indicata,
- volontà nel proseguire la terapia antiretrovirale e le profilassi delle infezioni opportunistiche, se indicate.

La perdita di uno o più criteri di inclusione determina l'uscita temporanea dalla lista fino al recupero di validità di tutti i criteri di inclusione.

I criteri di esclusione comprendono^[108]:

- diagnosi di patologie opportunistiche definenti l'AIDS negli ultimi due anni,
- positività di HHV8-DNA su sangue periferico,
- storia di neoplasia o malattia linfoproliferativa (eccezion fatta per carcinoma baso-cellulare ed il carcinoma in situ della cervice con *disease-free* documentata superiore ai 5 anni; la guarigione dalla patologia neoplastica dovrà essere certificata da uno specialista oncologo),
- allattamento in atto

Dal momento iniziale (*baseline*) del trapianto, per tutto il *follow-up*, sono stati monitorati i livelli plasmatici di RNA (RNA *viral load*) e i livelli del viral load DNA sia nella forma totale che episomiale ed il numero dei CD4 circolanti, ad intervalli mensili.

Il sangue di ogni paziente, ottenuto attraverso un prelievo endovenoso, è stato poi raccolto in provette contenenti EDTA, un anticoagulante, e processato entro tre ore dall'arrivo in laboratorio. Il plasma è stato separato dalla frazione cellulare attraverso centrifugazione a 2500 rpm per 20 minuti e successivamente congelato a -80°C fino al suo utilizzo per la quantificazione del viral load RNA.

I linfomonociti (PBMC) sono stati separati mediante Ficoll e i pellet dei singoli campioni, contenenti 5×10^6 cellule, sono stati congelati a -20°C fino al loro utilizzo per l'estrazione del DNA.

L'estrazione del DNA totale è stata eseguita mediante il kit *DNAeasy tissue* (Quiagen) e in seguito quantificato attraverso lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260/280 nm.

La quantificazione del *viral load* RNA stata eseguita col kit commerciale *Quantiplex HIV-1 RNA 3.0 Assay* (bDNA), in uso presso il nostro laboratorio.

La quantificazione del numero di copie di DNA provirale è stata eseguita, invece, mediante il saggio di PCR quantitativa *Real Time*, con lo strumento *LightCycler*^[90].

15.1 Il sistema Light Cycler

Il *Light Cycler* è un termociclatore rapido combinato con un fluorimetro a microvolume, che utilizza sofisticate lenti ottiche, impiegate in citofluorimetria.

L'aumento della temperatura e il raffreddamento sono controllati da un riscaldamento alternato dell'aria ambientale, utilizzata come mezzo di trasferimento del calore. E' possibile così ottenere nella camera termica una velocità di variazione molto rapida della temperatura che può raggiungere i 10°C/secondo.

Questa tecnica di variazione rapida della temperatura necessita di capillari di vetro molto sottili come contenitori della reazione di amplificazione. In considerazione dell'alto rapporto tra superficie e volume di questi capillari, si può avere, così, una notevole efficienza nel trasmettere il calore e ciò permette una maggior rapidità dei cicli.

Il Light Cycler è infatti uno dei termociclatori più veloci esistenti ed è in grado di eseguire fino a 30-40 cicli di PCR in 25-30 minuti. Inoltre ha la capacità di leggere, su tre distinti canali dell'unità ottica, tre diverse lunghezze d'onda e precisamente 530, 640 e 710 nm (**Fig. 15**).



Fig. 15: Lo strumento LightCycler (<http://www.lightcycler.html>).

15. 2 Determinazione quantitativa del DNA totale di HIV-1 nei linfomonociti dei pazienti arruolati nello studio

Il saggio di *SYBR Green PCR Real Time* viene eseguito in una soluzione di 20 μ l finali costituita da 10 μ l di *2X Quantitect SYBR Green PCR Master Mix (Quiagen)* contenente *HotStarTaq* DNA polimerasi, 0,5 μ l di ogni primer alla concentrazione di 200nM, e 200ng di DNA estratto dai linfociti dei pazienti o dalle diluizioni scalari della curva di riferimento.

L'amplificazione del gene *gag* mediante *LightCycler* è stata svolta nel seguente modo: attivazione della *HotStar Taq DNA polimerasi* a 95°C per 15 minuti a cui seguono 45 cicli suddivisi in quattro fasi: 95°C per 10 secondi (denaturazione), 60°C per 30 secondi (appaiamento), 72°C per 30 secondi (elongazione) e 75°C per 3 secondi .

Al termine dei cicli di amplificazione è stata quindi eseguita un'analisi di *melting* del prodotto ottenuto, attraverso un lento e progressivo aumento della temperatura (0.1°C/secondo) fino a 95°C.

L'amplificazione, l'acquisizione dei dati e la loro analisi sono state eseguite dal *LightCycler instrument* (Roche, Mannheim, Germany) con software dedicato (*LightCycler 5.3.2 software*; Roche).

Questo software è in grado di rivelare il *threshold cycle* (C_t), cioè il ciclo in cui l'intensità di fluorescenza ha raggiunto un valore significativo rispetto alla fluorescenza di base. C_t è direttamente proporzionale al \log_{10} del numero di copie di partenza.

Il profilo di amplificazione del bersaglio rivela un picco principale specifico con una temperatura di *melting* (T_m) di 81°C e talvolta, un altro picco minore a 77°C riconducibile alla formazione di prodotti aspecifici (*dimer primer*).

In tutti i nostri esperimenti abbiamo, perciò, eseguito la quantificazione del prodotto specifico a 78°C per evitare l'eventuale interferenza data dai prodotti aspecifici.

Il segnale fluorescente di ogni campione, generato durante la reazione di amplificazione, viene evidenziato con una tipica curva sigmoide, che aumenta all'aumentare del prodotto amplificato e poi raggiunge un *plateau*. (Fig. 16).

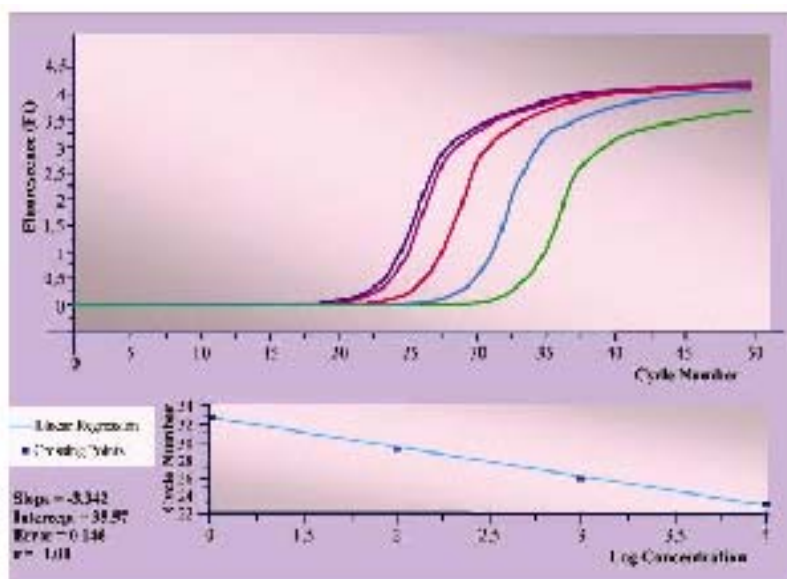


Fig. 16: Grafico di fluorescenza e grafico di correlazione evidenziabile in alcuni campioni della curva standard.

Come sistema di rivelazione abbiamo scelto il **SYBR Green** poichè, rispetto alle altre tecniche di rivelazione, è vantaggioso per quanto riguarda flessibilità, applicabilità e costi. Il SYBR Green è un fluoroforo che si lega al DNA bicatenario e il cui segnale di fluorescenza (misurato a 530 nm) aumenta proporzionalmente all'aumento della quantità di DNA a doppio filamento durante i vari cicli di PCR (Fig. 17).

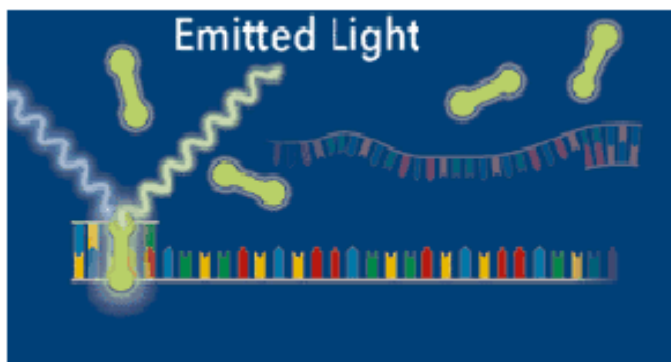


Fig. 17: Legame del SYBR Green ed emissione di fluorescenza.

La caratteristica del SYBR Green di legare tutte le molecole a doppia catena di DNA obbliga ad un'accurata analisi della curva di *melting* data dai prodotti neoformati (*ampliconi*), in modo da discernere con precisione la presenza di amplificati specifici rispetto ad eventuali prodotti aspecifici o *dimer primers* che possono formarsi durante la reazione di PCR e che devono, ovviamente, essere esclusi dalla quantificazione finale.

L'analisi della temperatura di dissociazione è importantissima per caratterizzare il prodotto di PCR. Infatti la temperatura di dissociazione o *temperatura di Melting* (T_m) viene definita come la temperatura alla quale il 50% del DNA si trova come singolo filamento. Ogni frammento di DNA si dissocia ad una caratteristica temperatura (T_m). Il Light Cycler, monitorando continuamente la reazione di PCR, permette di determinare la T_m del frammento studiato. Questa fase è facilmente evidenziabile poiché è registrato un calo della fluorescenza, dovuto alla scissione del SYBR Green dall'amplificato ^[91].

Per determinare la curva di riferimento standard abbiamo utilizzato concentrazioni scalari del plasmide *Alfa-Wassermann* da 10 a 10^6 copie/diluizione.

HIV-1 è un virus che, come noto, è caratterizzato da un'estrema variabilità di sequenza e questa caratteristica biologica richiede quindi un'attenta valutazione della coppia di *primer* da utilizzare per la diagnosi attraverso la reazione di PCR.

Abbiamo utilizzato una coppia di *primer* specifici nei confronti di una regione estremamente conservata del gene *gag*, tra i vari sottotipi di HIV-1, che amplifica un frammento di 142 paia di basi.

La sequenza di questi *primer* è la seguente:

5'-TGCTATGTCAGTTCCCCTTGGTTCTCT-3'

5'-AGTTGGAGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT-3'

Tutte le diluizioni della curva di riferimento ed i campioni positivi e negativi sono stati saggiati in duplicato e il valore medio del numero di copie è stato utilizzato come risultato finale. I dati finali sono stati espressi come numero di copie/ 10^6 cellule.

Per tutti i campioni clinici testati è stato eseguito in parallelo un controllo di amplificazione, nelle stesse condizioni, con *primer* per il gene della globina.

15.3 Determinazione quantitativa del DNA episomiale di HIV-1 nei linfomonociti dei pazienti arruolati nello studio

Per la valutazione del DNA episomiale è stata amplificata la regione **2LTR** del virus. Il kit utilizzato per la quantificazione con *Real Time* PCR è stato il *DNA Fast Start Master Hybridization Probe* (Roche) con 4mM MgCl₂, 18pmoli *primers* (50 µM) e 200nM di sonda.

L'amplificazione mediante *LightCycler* è stata svolta nel seguente modo: attivazione della *HotStar Taq DNA polimerasi* a 95°C per 25 secondi a cui seguono 45 cicli suddivisi in diverse fasi:

Attivazione : 95°C per 10 minuti

Amplificazione: 95°C per 20 secondi
60°C per 20 secondi
72°C per 20 secondi

Raffreddamento: 40°C per 30 secondi.

Anche per quanto riguarda il DNA 2LTR l'amplificazione, l'acquisizione dei dati e la loro analisi sono state eseguite dal *LightCycler instrument* (Roche, Mannheim, Germany) con software dedicato (LightCycler 5.3.2 software; Roche).

La differenza fondamentale rispetto alla metodica utilizzata per il DNA totale risiede nella marcatura degli amplificati, necessaria per la loro quantificazione.

In questo caso infatti viene utilizzata, al posto del il SYBR Green, una sonda oligonucleotidica fluorogena, che riconosce sequenze specifiche all'interno della sequenza bersaglio, perciò non è più necessario eseguire un'analisi di melting, poiché essa elimina il problema dell'amplificazione di *dimer primers* aspecifici.

L' *Hybridization Probe* è una sonda di tipo esonucleasica (**sonda TaqMan**) marcata con fluorescina (FAM) e rodamina (TAMRA). Le sonde di tipo *TaqMan*, infatti, sono oligonucleotidi marcati all'estremo 5' con una molecola reporter fluorocromica e all'estremo 3' con una molecola *quencher*^[92].

La sonda in sé non emette fluorescenza perché la vicinanza del *quencher* al *reporter* ne impedisce l'emissione.

Nel corso della reazione essa si va ad appaiare a sequenze interne all'amplificato ed è l'enzima Taq polimerasi che, mentre sintetizza il filamento di DNA complementare al template, raggiunge la sonda, la scalza dalla sua posizione e ne determina così l'idrolisi, che allontana il *reporter* dal *quencher* e ciò porta all'emissione del segnale di fluorescenza (Fig. 18).

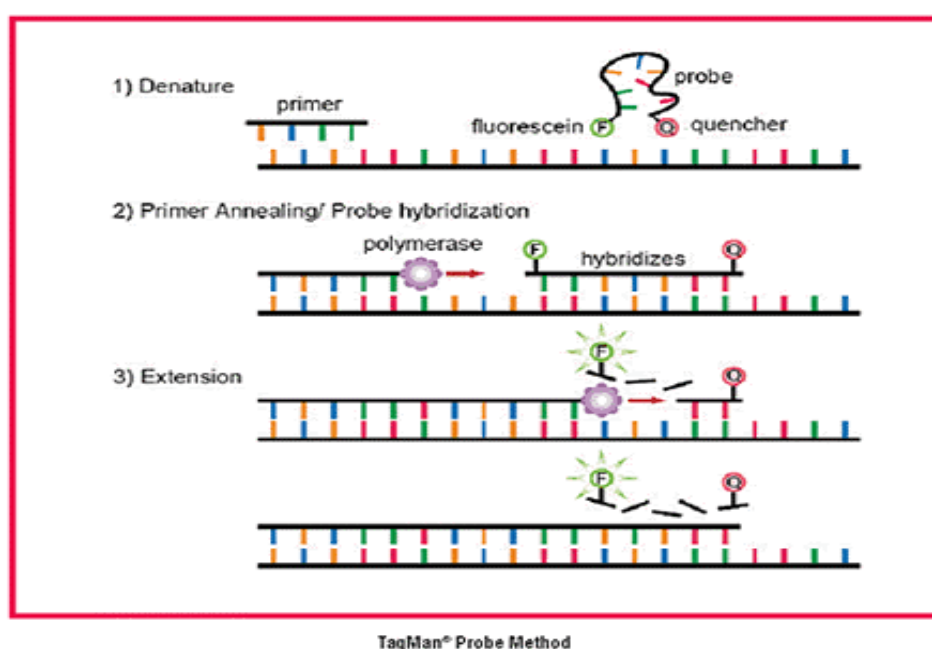


Fig. 18: Caratteristiche di attivazione della sonda TaqMan

Per l'amplificazione di tale regione, abbiamo utilizzato i seguenti *primer*:

2n 5'-CAGATCTGGTCTGGTCTTAACCAGAGA-3'

4n 5'-GTAAGTAGAGATCCCTCAGAC-3'

La sequenza della sonda è^[80]:

FAM-AGTGGCGAGCCCTCAGATGCTGC-TAMRA

Anche in questo caso tutte le diluizioni della curva di riferimento, preparata con diluizioni scalari del plasmide contenente la regione 2LTR come inserto, i campioni positivi e quelli negativi sono stati saggiati in duplicato e il valore medio del numero di copie è stato utilizzato come risultato finale.

I dati finali sono stati espressi come numero di copie/10⁶ cellule.

Inoltre per tutti i campioni clinici testati è stato eseguito in parallelo un controllo di amplificazione, nelle stesse condizioni, con *primer* per il gene della globina

16.0 RISULTATI

Lo studio è stato condotto su cinque pazienti HIV-1 positivi, ex- tossicodipendenti, trapiantati di fegato per insufficienza epatica terminale (cirrosi epatica ed epatocarcinoma). Quattro con documentata coinfezione da HCV ed uno con coinfezione da HBV ed HCV (tab 2). Al momento del trapianto, i pazienti presentavano un'infezione da HIV clinicamente stabile e ben controllata rientrando, quindi, in uno dei criteri di inclusione del protocollo trapianti (*viral load* RNA inferiore alle 50 copie/ml ed un numero di CD4 >200 cellule/mmc).

Pazienti	Causa trapianto di fegato	Coinfezione
N° 1	Epatocarcinoma	HCV
N° 2	Epatocarcinoma	HBV, HCV
N° 3	Cirrosi	HCV
N° 4	Cirrosi	HCV
N° 5	Cirrosi	HCV

Tab 2: caratteristiche pre-trapianto dei cinque pazienti

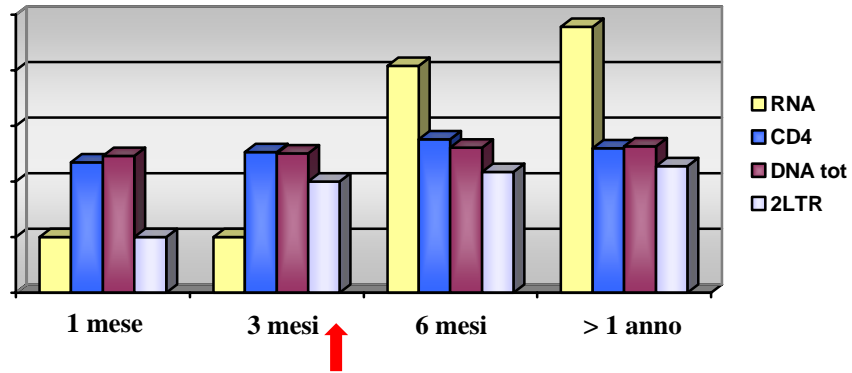
Sono stati, poi, seguiti, nel *follow-up* post-trapianto, valutando mensilmente l'andamento dei parametri virologici di HIV ed immunologici.

Per quanto riguarda i restanti esami, come le profilassi anti-infettive, sono stati effettuati controlli secondo gli schemi in uso presso i singoli centri di trapianto.

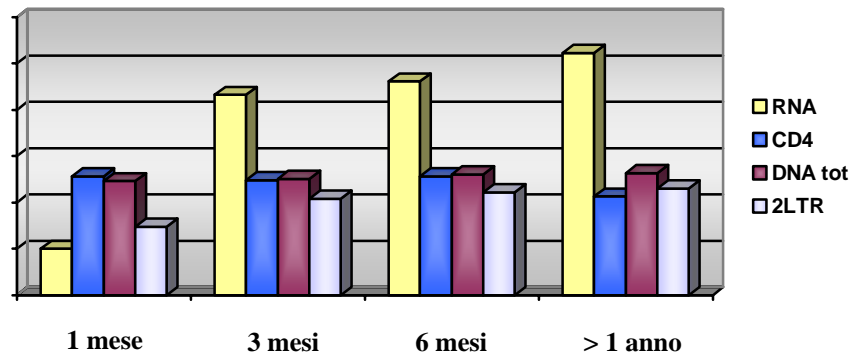
Abbiamo analizzato il contenuto del carico provirale di ciascun paziente, valutando sia il DNA totale che la forma episomiale. I campioni sono stati testati in duplicato ed in ciascuna seduta sono stati inseriti, come controlli negativi, linfociti provenienti da donatori di sangue. I risultati sono stati poi confrontati con gli altri parametri, quali carica virale e numero dei linfociti CD4, necessari per la valutazione di una corretta gestione del paziente infetto.

I risultati ottenuti, durante il *follow-up* post-trapianto, hanno messo in evidenza due andamenti diversi da un punto di vista virologico di HIV:

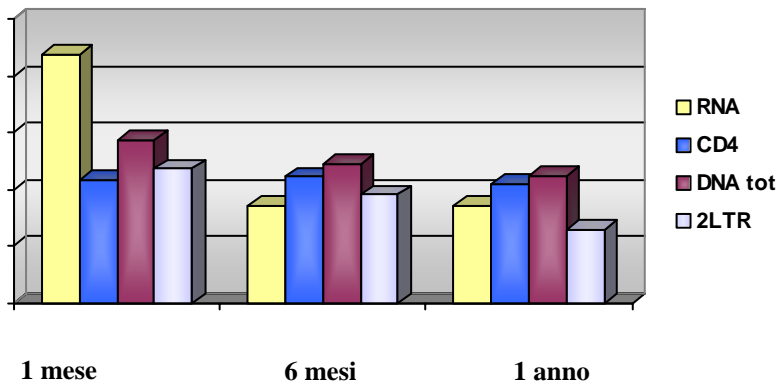
- due pazienti (n° 1, 2) hanno evidenziato un aumento significativo del *viral load* RNA (>0,50 log) a distanza di un anno e mezzo dal trapianto (1,68 contro 4,78 log, 1,68 contro 5,23 log, rispettivamente) (graf.1,2). Per quanto riguarda il carico provirale, mentre i livelli di DNA totale sono rimasti piuttosto costanti nel tempo, si è osservato un incremento della forma episomale in concomitanza alla crescita della carica virale, in tutti e due i pazienti (pz. n°1 1 contro 2,28 log, nel pz.n°2 1,47 contro 2,30 log). In particolare, nel paziente n° 1, l'aumento del 2LTR è risultato evidente già a distanza di qualche mese dal trapianto ancora prima del *rebound* virale (1log a distanza di un mese e 2log al terzo mese) (graf 1). Il numero dei CD4 è rimasto costante nel pz. n° 1 mentre, nel pz.n°2 è diminuito del 30%, valore considerato statisticamente significativo secondo le linee guida internazionali.
- In tre pazienti (n° 3, 4, 5), a distanza di un anno e mezzo dal trapianto, si è osservato un calo significativo (> 0,5 log) del *viral load* RNA (4,04 contro 1,69 log, 4,38 contro 1,69 log e 3,81 contro 1,82 log rispettivamente) e durante tutto il *follow-up* due pazienti (n° 3, 4) hanno mantenuto valori al di sotto delle 50 copie/ml (graf 3, 4). Il paziente n° 5 ha evidenziato un andamento altalenante (graf 5). I livelli di DNA provirale totale sono calati dello 0,50 log, nel paziente n° 3 (2,86 contro 2,24 log), mentre nei pz n° 4 e 5 si è assistito ad un calo, ma non significativo (2,73 contro 2,25 e 2,78 contro 2,90 log). I livelli del 2LTR sono calati in maniera statisticamente significativa fino a valori non più determinabili nei pazienti n° 3 e 4 (2,36 contro 1 log, 2,17 contro 1 log) e nel paziente n° 5 sono rimasti costanti (2,17 contro 1,99 log) (graf 3,4,5). Nei pazienti n° 4 e 5 si è assistito ad un ripristino del 30% nel numero dei CD4, mentre sono rimasti costanti nel pz.n° 3.



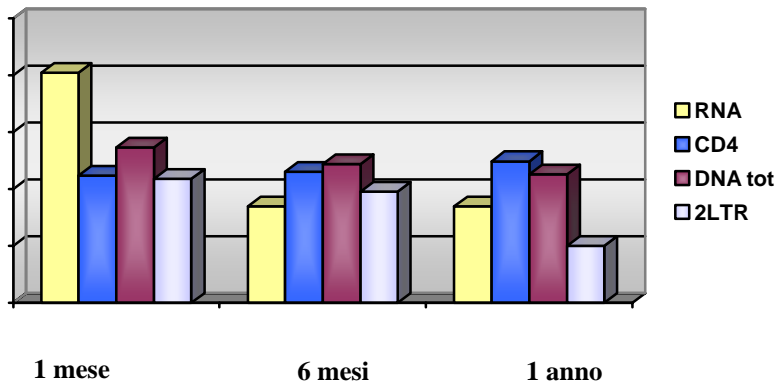
Graf. 1: andamento dei quattro parametri nel paziente n°1



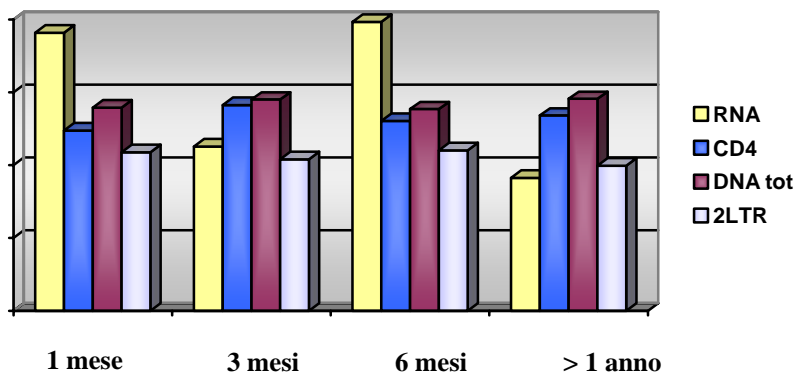
Graf. 2: andamento dei quattro parametri nel paziente n°2



Graf. 3: andamento dei quattro parametri nel paziente n°3



Graf. 4: andamento dei quattro parametri nel paziente n°4



Graf. 5: andamento dei quattro parametri nel paziente n°5

17.0 DISCUSSIONE

L'evidenza della significativa riduzione della viremia plasmatica associata all'arresto del depauperamento del sistema immunitario, in seguito alla introduzione della terapia di combinazione con più farmaci antivirali (HAART *highly active antiretroviral therapy*), generò, negli anni '96-99, un cauto ottimismo. Studi successivi hanno dimostrato, però, che la replicazione virale non solo non viene completamente interrotta dalla terapia, ma che l'evoluzione del virus procede determinando l'emergenza di ceppi resistenti e la divergenza evolutiva delle quasispecie virali nelle sottopopolazioni cellulari che ospitano l'infezione. Numerosi dati, infatti, evidenziano come i livelli di DNA provirale persistano per lunghi periodi di tempo, rappresentando il *reservoir* reale dell'infezione, a dispetto delle terapie attualmente applicate^[97-98]. La valutazione quantitativa del DNA provirale diventa, quindi, un obiettivo di grande interesse che può avere delle ripercussioni nella valutazione della terapia e nella comprensione dell'evoluzione dell'infezione.

Pertanto, l'obiettivo del nostro studio è stato quello di monitorare l'evoluzione virologica ed immunologica in un gruppo particolare di pazienti, sottoposti a trapianto di fegato, soffermando l'attenzione sull'andamento del *viral load* DNA ed in particolare sul possibile ruolo del 2LTR, come marcatore di infezione.

Allo stato attuale del *follow-up*, a distanza di un anno e mezzo dal trapianto, tutti e cinque i pazienti sono viventi: due pazienti (n°1 e 2), per i quali il trapianto è stato effettuato per epatocarcinoma, hanno sviluppato una recidiva del tumore, con una aspettativa di vita non favorevole; tre pazienti (n° 3, 4, 5) si trovano, invece, in buone condizioni e due (n° 3, 4) con funzione epatica ed infezione da HIV stabile.

Da un punto di vista virologico di HIV, abbiamo diviso i cinque pazienti in base dell'andamento della viremia plasmatica.

Nei pazienti n° 1 e n° 2 (grf 1, 2), in concomitanza all'aumento dell'RNA virale, si evidenzia un aumento del 2LTR, mentre i livelli di DNA totale rimangono piuttosto costanti nel tempo. In particolar modo, nel paziente n° 1 l'aumento della forma episomiale risulta visibile ancora prima del *rebound* virale. Infatti, da un valore al di sotto delle 10

copie/ 1×10^6 PBMCs, a distanza di un mese dal trapianto, si assiste ad un aumento di un log al terzo mese, quando ancora il *viral load* RNA è al di sotto delle 50 copie/ml. Questo

potrebbe essere un dato interessante in quanto diversi studi hanno messo in relazione la presenza della forma 2LTR come possibile marker di reinfezione cellulare. La sua presenza, pertanto, potrebbe essere legata alla continua produzione di nuove cellule infette. Nei pazienti n° 3, 4, 5, in cui si osserva un calo significativo del *viral load* RNA fino a valori non più determinabili nei pz.3 e 4, si assiste ad un calo significativo della forma episomiale (<0,5 log) fino a valori non più quantificabili nei pz 3 e 4 (graf 3, 4). In questi, inoltre, si osserva un calo del *viral load* RNA fino a valori <50 copie/ml. I livelli di DNA totale subiscono un decremento anche se non significativo, tranne nel pz n° 3, in cui il calo è superiore allo 0,50 log. Questo potrebbe confermare il dato che una terapia efficace possa essere in grado di controllare il livello di *viral load* DNA per un certo periodo di tempo.

La mancata evidenza di DNA 2LTR, nei pazienti in cui la viremia si abbassa fino a valori non più quantificabili, potrebbe rappresentare un marker di efficacia terapeutica. Alcuni studi hanno messo in evidenza come vi sia un calo di questo marker, addirittura dopo la prima settimana di terapia antiretrovirale^[107].

Sicuramente, riuscire ad individuare un marker di replicazione residua di HIV in corso di terapia antiretrovirale, in grado di predire un *rebound*^[83,84,85,86,89] virale, potrebbe avere delle ripercussioni molto importanti, nella gestione di una corretta terapia. Inoltre la presenza di cellule infettate in modo latente rappresenta un serbatoio inesauribile, pronto a produrre nuovo virus in seguito ad un'interruzione della terapia.

In particolar modo, in tali pazienti, la terapia antiretrovirale resta una decisione clinica complessa, che deve tener conto di tutte quelle che possono essere le possibili interazioni con i farmaci immunosoppressivi e con il trattamento per le recidive di epatite C e B. Esistono, infatti, interazioni farmacologiche che condizionano livelli subterapeutici degli antiretrovirali o degli immunosoppressori, per cui il dosaggio degli immunosoppressori deve essere adeguato, sulla base delle interazioni, alla terapia antiretrovirale proposta.

La terapia immunosoppressiva verte sull'utilizzo di farmaci immunosoppressori, regolarmente utilizzati nei protocolli terapeutici (*ciclosporina, tacrolimus, micofenolato mofetil, rapamicina, steroidi*), privilegiando gli inibitori della calcineurina.

I livelli ematici dei farmaci devono essere monitorati quotidianamente dopo l'inizio della HAART. Cambiamenti nella terapia antiretrovirale devono comportare una revisione dei dosaggi dei farmaci immunosoppressori. Le esperienze preliminari documentano che con l'impiego degli inibitori delle proteasi (PI) si osserva una significativa interferenza con il

tacrolimus che è stato somministrato alla dose di 1 mg/settimana. Alla luce della già complessa interazione tra PI e *tacrolimus*, l'uso di azoli antifungini e di *rapamicina* viene scoraggiato. Meno pronunciate sono le interferenze tra *tacrolimus* e gli inibitori non nucleosidici della transcriptasi inversa (NNRTI).

Il trattamento degli episodi di rigetto si effettua secondo gli schemi convenzionali evitando l'impiego di ATG o anticorpi monoclonali, se non strettamente necessario.

La profilassi della recidiva dell'infezione da HCV si ottiene mediante trattamento con interferone pegilato associato a ribavirina secondo i protocolli in uso presso le strutture deputate alla gestione del *follow-up*. La profilassi della recidiva dell'infezione da HCV va iniziata, non appena le condizioni cliniche del paziente lo consentano, auspicabilmente nelle prime 2-4 settimane post trapianto o, in casi selezionati di candidati in classe A secondo Child con HCC, in fase pretrapianto al fine di ridurre la viremia di HCV e la probabilità di reinfezione. Si raccomanda uno stretto monitoraggio di HCV-RNA quantitativo su sangue periferico (ai giorni 0, 7, 14, 28 e quindi mensilmente), indipendentemente dall'inizio di profilassi o terapia antivirale specifica, anche nei pazienti con viremia da HCV stabilmente non rilevabile nel pre-trapianto, al fine di documentare l'eventuale recidiva ed iniziare tempestivamente il trattamento antivirale. Allo scopo di stabilire l'entità del danno epatico correlato alla reinfezione ed escludere altre cause di danno epatico, si raccomanda, prima di iniziare il trattamento antivirale, l'esecuzione di una biopsia epatica. Successive biopsie possono essere effettuate, su indicazione del Centro Trapianti e dell'U.O. di Malattie Infettive, per il monitoraggio della risposta alla terapia o per documentare altre cause di danno epatico. Il trattamento antivirale viene effettuato con Interferone pegilato più Ribavirina, secondo i protocolli in uso presso le strutture deputate alla gestione del *follow-up*. Per quanto riguarda la durata della terapia, si consiglia di proseguire il trattamento per un anno nel post-trapianto. L'uso contemporaneo alla Ribavirina di ddI e/o d4T e/o AZT e/o Micofenolato e/o Azatioprina andrebbe possibilmente evitato. Viene consentito l'uso di fattori di crescita per prevenire e/o superare le citopenie secondarie alla terapia.

In tutti i pazienti vengono controllati mensilmente i livelli di acido lattico venoso e ricercati i possibili danni d'organo associati a danno mitocondriale.

La profilassi della recidiva dell'infezione da HBV viene effettuata mediante somministrazione, a tempo indefinito, di immunoglobuline anti-HBs, titolate per mantenere

i livelli plasmatici > 100 UI/ml e lamivudina (100 mg/die se non specificamente prevista dal protocollo HAART, altrimenti 300 mg/die). Nei pazienti con mutazioni nel genoma di HBV associate a resistenza alla lamivudina, viene somministrato, anche, adefovir o tenofovir^[108].

I regimi da utilizzare e le indicazioni sul comportamento in caso di tossicità o inefficacia sono quelli consigliati dalle linee guida internazionali.

Allo stato attuale delle conoscenze, sicuramente il trapianto di fegato, in soggetti con infezione da HIV, rappresenta ancora una realtà piuttosto complessa che rende indispensabile la coesistenza, presso i centri trapianto, di competenze plurispecialistiche in grado di garantire una gestione corretta della terapia antirigetto e delle problematiche correlate all'infezione da HIV.

Sebbene tale studio, basato su un numero limitato di pazienti, rappresenti uno studio preliminare, tuttavia esso evidenzia come la possibilità di quantificare il virus all'interno delle cellule apra prospettive interessanti.

In particolar modo la presenza o l'assenza del 2LTR potrebbe essere considerata un marker di efficacia terapeutica ed un parametro di reinfezione cellulare^[78,79,80,81,82]. Inoltre, la persistenza della forma 2LTR potrebbe costituire una continua fonte di proteine virali con importanti conseguenze patogenetiche.

Riuscire, quindi, a studiare a fondo i serbatoi di HIV, cercando di capire come il bilancio tra le cellule produttivamente infette o quelle latentemente infettate possa cambiare nel corso della progressione della malattia, rappresenta un elemento di rilevanza notevole per chiarire alcuni aspetti della patogenesi dell'infezione da HIV.

Diventa, allora, fondamentale l'esigenza di individuare nuove strategie in grado di permettere un controllo a lungo termine dell'infezione e solo una attenta lettura dei diversi parametri virologici, immunologici e clinici può rappresentare l'arma migliore, se non per sconfiggere il virus, sicuramente per contenerne, il più possibile, i danni.

Concludendo, questi dati indicano un ruolo fondamentale dei *reservoir* virali nel mantenimento e nella progressione della malattia da HIV e suggeriscono l'utilità di approcci terapeutici mirati all'inibizione virale in tali distretti cellulari e tissutali. In attesa di ulteriori passi avanti in questa direzione è di fondamentale importanza, nel *follow-up* del paziente infetto, il monitoraggio del virus in questi compartimenti, per una più corretta previsione relativa alla progressione della malattia.

Quindi, sicuramente l'analisi del carico provirale, mediante *Real time* PCR, si propone come una metodologia innovativa che può fornire informazioni fondamentali sui tempi di decadimento del DNA provirale e sui *reservoir* dell'infezione.

Ulteriori studi longitudinali, con ampi *follow-up*, sono necessari per comprendere meglio il ruolo di tale marker nella prognosi della malattia da HIV ed eventualmente per un suo inserimento futuro nella pratica clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. La Placa M. *Principi di microbiologia medica*, 524-548; 561-569; 665-679, ed. Esculapio.
2. Re M.C. *Il laboratorio virologico nella diagnosi di infezione da HIV e nel monitoraggio del paziente infetto* (disponibile su: <http://www.bioetica-vssp.it/temi.html>).
3. Barre-Sinoussi F., Cherman J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Charmeret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vèzinet Brun F., Rluzioux C., Rozembaum W., Montagnier L. *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)*. Science 220: 868-871, 1983.
4. Shaw G.M., Wong-Staal F., Gallo R.C., *Etiology of AIDS. Virology, molecular biology and evolution of human immunodeficiency viruses*. In: AIDS 1988.
5. Cohen EA, Subbramanian RA, Gottlinger HG. *Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 214:219-235, 1996.
6. Kaplan AH, Manchester M, Swanstrom R. *The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency*. J Virol. 68(10):6782-6, 1994.
7. Kohlstaedt LA., Wang J., Friedman JM., Rice PA., Steitz TA. *Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor*. Science 256(5065):1783-90, 1992.
8. Rice P, Craigie R, Davies DR. *Retroviral integrases and their cousins*. Curr Opin Struct Biol. 6(1):76-83, 1996.
9. Clapham PR, Weiss RA. *Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors*. Nature. 388(6639):230-1, 1997.
10. Hernandez LD, Hoffman LR, Wolfsberg TG, White JM. *Virus-cell and cell-cell fusion*. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 12:627-61, 1996.
11. Hill CP, Worthylake D, Bancroft DP, Christensen AM, Sundquist WI. *Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(7):3099-104, 1996.
12. Gamble TR, Yoo S., Vajdos FF., Hill CP. *Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein*. Science. 278: 849- 853, 1997.
13. Gibellini D., Re M.C., Vitone F., Rizzo N., Maldini C., La Placa M., Zauli G. *Selective up-regulation of functional CXCR4 expression in erythroid cells by HIV-1 Tat protein*. Clin. Exp. Immunol. 131: 428-435, 2003.
14. Re M.C., Gibellini D., Vitone F., La Placa M. *Antibody to HIV-1 Tat protein, a key molecule in HIV-1 pathogenesis. A brief review*. New. Microbiol. 2482: 197-205, 2001

15. Lewer A. *Regulatory protein of HIV*. Medical Virology 1: 155-163, 1991.
16. Emerman M. *HIV-1, Vpr and the cell cycle*. Curr Biol. 6(9):1096-1103, 1996.
17. Camaur D., Trono D. *Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation*. J Virol. 70(9):6106-6111, 1996.
18. Cohen E.A., Subbramanian R.A., Gottlinger H.G. *Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 214: 219-235, 1996.
19. Sattentau Q.J., Weiss R.A. *CD4: HIV receptor and physiological ligand*. Cell. 52: 631-633, 1988.
20. Pantaleo G., Graziosi C., Fauci A.S. *New concept in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. N. Engl. J Med. 328 (5): 327-355, 1993.
21. Kaplank H.A., Manchester M., Swanstrom R. *The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency*. J. Virol. 68 (10): 6782-6786, 1994.
22. Coffin J.M. *Genetic diversity and evolution of retroviruses*. Curr. Top. Microbiol. Immunology 76: 143-164, 1992.
23. Pantaleo G., Graziosi C., Demaresi J.F. *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease*. Nature 362: 355-359,1993.
24. Pantaleo G., Graziosi C., Fauci A.S. *The immunopathogenesis of human deficiency virus infection*. N. Engl. J Med. 328: 327-335, 1993.
25. Re MC., Zauli G., Gibellini D., Furlini G., Ramazzotti E., Monari P., Ranieri S., Capitani S., La Placa M. *Uninfected haematopoietic progenitor (CD34+) cells purified from the bon marrow of AIDS patients are committed to apoptotic cell death in culture*. AIDS 7: 1049-1055, 1993.
26. Zauli G., Vitale M., Re MC., Furlini G., Zamai L., Falcieri E., Gibellini D., Visani G., Davis B.R., Capitani S. et al. *In vitro exposure to human immunodeficiency virus type 1 induces apoptotic cell death of the factor-dependent TF-1 haematopoietic cell line*. Blood.83: 167-175, 1994.
27. Romito A., Grizzuti M.A., Tucci M., Silvestris F. *Malignant neoplasm and AIDS*. Recenti Prog. Med. 88: 348-355,1997.
28. Del Canto M.C. *Mechanism of HIV infection of the central nervous system and pathogenesis of AIDS-dementia complex*. Neuroimaging Dlin. N. Am. 7: 231-241, 1997.
29. Nuwayhid N.F. *Laboratory test for detection of human immunodeficiency virus type 1 infection*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2 (6): 637-645, 1995.
30. Bru-Vezinet F., Simon F. *Diagnostic tests for HIV infection*. In: Armstrong D., Cohen J., editors. Infectious Diseases. London: Mosby, 5.23.1-10.-03, 1999.
31. Cassol S.A., Lapointe N., Salas T., Hankins C., Arella M., Fauvel M., Delage G., Boucher M., Samson J., Charest J., et al. *Diagnosis of vertical HIV-1 transmission using the*

32. *polymerase chain reaction and dried blood spot specimens*. J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. 5 (2) : 113-119, 1992.
33. Eisen H.N. and Siskind G.W. *Variations in affinities of antibodies during the immune response*. Biochemistry 3: 389-393, 1984.
34. Puchhammer-Stockl E., Schmied B., Rieger A. and Hofmann H. *Low proportion of recent HIV infections among newly diagnosed cases of Hiv infection as shown by the presence of HIV-specific antibodies of low avidity*. J. of Clin. Microbiol.1: 497-498, 2005.
35. Van Binsbergen J., Keur W., Siebelink A., Van de Graaf M., Jacobs A., De Rijk D., Gurtler L.G. *Strongly enhanced sensitivity of a direct anti-HIV-1/2 assay in seroconversion by incorporation of HIV p24 Ag detection: a new generation Vironostika HIV Uni-Form II*. J Virol.Methods, 76: 59-71, 1998.
36. Carpenter C.C., Fischl M.A., Hammer S.M., Hirsch M.S., Jacobsen D.M., et al. *Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997*. Updated recommendations of the International AIDS Society-USA panel. JAMA 277 (24): 1962-1969, 1997.
37. Hirsch M.S., Brun-Vezinet F., D'Aquila R.T., et al. *Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection*. Recommendations of an International AIDS Society-USA panel. JAMA 283: 2417-2426, 2000.
38. Poveda E., Briz V., Soriano V. *Enfuvirtide: the first fusion inhibitor to treat HIV-1 infection*. AIDS Rev. 7: 139-147, 2005.
39. Kuritzkes D.R. *Clinical significance of drug resistance in HIV-1 infection*. AIDS 10 Suppl. 5: S27- S31, 1996.
40. Hirsch M.S., Conway B., D'Aquila R.T., et al. *Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: implication for clinical management*. JAMA 279: 1984-1991,1998.
41. Roberts JD., Bebeneck K., Kukel T.A. *The accuracy of reverse trascriptase from HIV-1*. Science 242: 1171-1173, 1988.
42. Pillay D., Taylor S., Richman D.D. *Incidence and impact of resistance against approved antiretroviral drugs*. Rev. Med. Virol. 10: 231-253, 2000.
43. Re M.C., Monari P., Bon I., Gibellini D., Vitone F., Borderi M., La Placa M. *Analysis of HIV-1 drug resistance mutations by line probe assay and direct sequencing in a cohort of therapy naïve HIV-1 infected Italian patients*. BMC. Microbiol. 1 (1) 30, 2001.
44. Little S.J., Daar E.S., D'Aquila R.T., et al. *Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with HIV infection*. JAMA 282 (12): 1142-1149, 1999.
45. Pillay D., Cane P.A., Shirley J., et al. *Detection of drug resistance associated mutations in HIV primary infection within the U.K*. AIDS 14: 906-908, 2000.
46. Re M.C., Monari P., Bon I., Borderi M., Gibellini D., Schiavone P., Vitone F., Furlini G., La Placa M. *Development of drug resistance in HIV-1 patients receiving a combination of stavudine, lamiduvine and efavirenz*. I. J. of Antimicrob. 20; 223-226, 2002.
47. Wegner S.A., Brodine S.K., Mascola J.R., et al. *Prevalence of genotyping and phenotyping resistance to anti-retroviral drugs in a cohort of therapy-naïve HIV-1 infected US military personnel*. AIDS 14: 1009-1015, 2000.

48. Flexner C. *HIV genotype and phenotype arresting resistance?* JAMA 283: 2442-2444, 2000.
49. Durant J., Clevenbergh P., Halfon P., et al. *Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial.* Lancet 353 (9171): 2195-2199, 1999.
50. Re M.C., Monari P., Borderi M., Tadolini M., Verucchi G., Vitone F., Spinosa S., La Placa M. *Presence of genotypic resistance to antiretroviral drugs in a cohort of therapy-naive HIV-1 infected Italian patients.* J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 1; 27 (3): 315-316, 2001.
51. Verhofstede C., Reniers S., Van Wanseele F., Plum J. *Evaluation of proviral copy number and plasma RNA levels as early indicators of progression in HIV-1 infection: correlation with virological and immunological markers of disease.* AIDS 8 (10): 1421-1427, 1994.
52. Mellors J.W., Rinaldo Jr C.R., Gupta P., White R.M., et al. *Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma.* Science 272: 1167-1170, 1996.
53. Re M.C., Vignoli M., Furlini G., Gibellini D., Colangeli V., Vitone F., La Placa M. *Antibodies against full-length Tat protein and some low-molecular-weight Tat peptides correlate with low or undetectable viral load in HIV-1 seropositive patients.* J. Clin. Virol. 21 (1): 81-89, 2001.
54. Baumberger C., Kinloch-de-Loes S., Yerly S., Hirschel B., Perrin L. *High levels of circulating RNA in patients with symptomatic HIV-1 infection.* AIDS 7 (suppl. 2): S59-64, 1993.
55. Lewin S.R., Vesananen M., Kostrikis L., Hurley A., Duran M., Zhang L., Ho D.D., Markowitz M. *Use of real-time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy.* J. Virol. 73, 6099-6103, 1999.
56. Todd J., Pacht C., White R., Yeghiazarian T., Johnson P., Taylor B., Holodniy M., Kern D., Hamren S., Chernoff D., Urdea M. *Performance characteristic for the quantitation of plasma HIV-1 RNA using branched DNA signal amplification technology.* J. Acqui. Im. Def. Synd. Hum. Retrovirology. 10: S35-S44, 1995.
57. Haggerty CM., Pitt E., Siciliano R. *The latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells and other viral reservoirs during chronic infection: insights from treatment-interruption trials.* Curr. Opinion in HIV and AIDS 1: 62-68, 2006.
58. Finzi D., Hermankova M., Pierson T., et al. *Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy.* Science 278: 1295-1300, 1997.
59. Chun TW, Carruth L, Finzi D, et al. *Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection.* Nature 387: 183-188, 1997.
60. Ruff CT, Ray SC, Kwon P, et al. *Persistence of wild-type virus and lack of temporal structure in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in paediatric patients with extensive antiretroviral exposure.* Journal of Virology 76: 9481-9492, 2002.
61. Nickle D, Shriner D, Mittler J, et al. *Importance and detection of virus reservoirs and compartments of HIV infection.* Curr Opin Microb 6: 410-416, 2003.

62. Pierson, T., Hoffman, T. L., Blankson, J. *et al.* *Characterization of chemokine receptor utilization of viruses in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1.* Journal of Virology 74: 7824- 7833, 2000.
63. Chun TW, Engel D, Berrey MM, *et al.* *Early establishment of a pool of latently infected resting CD4+ T cells during primary HIV-1 Infection.* Proc Natl Acad Sci USA 95: 8869-8873,1998.
64. Lori F, Jessen H, Lieberman J, *et al.* *Treatment of human immunodeficiency virus infection with hydroxyurea, didanosina and a protease inhibitor before seroconversion is associated with normalized immune parameters and limited viral reservoir.* J. Infect. Dis. 180: 1827-1832, 1999.
65. Zhang L, Ramratanam B, Tenner- Racz K, *et al.* *Quantifying residual replication in patients receiving combination antiretroviral therapy.* N Engl J Med 340: 1605-1613, 1999.
66. Strain M, Little S, Daar E, *et al.* *Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1.* J Infect Dis 191: 1410-1418, 2005.
67. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, *et al.* *Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy.* Nature Medicine 5: 512–517, 1999.
68. Siciliano JD, Kaydas J, Finzi D, *et al.* *Long term follow-up studies confirm the extraordinary stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells.* Nat. Med. 9: 727-728, 2003.
69. Muller V, Viguera-Gomez JF, Bonhoeffer S. *Decelerating decay of latently infected cells during prolonged therapy for human immunodeficiency virus type 1 infection.* J. Virology 75: 4091-4102, 2002.
70. Daves RT Jr, Bhat N, Yoder C, *et al.* *HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression.* Proc Natl Acad Sci USA 96: 15109-15114, 1999.
71. Balestra E, Perno CF, Aquaro S, *et al.* *Macrophages: a crucial reservoir for human immunodeficiency virus in the body.* J Biol Regul Homeost Agents 15: 272-276, 2001.
72. Zhu T. *HIV-1 in peripheral blood monocytes: an underrated viral source.* J Antimicrob Chemother 50: 309-311, 2002.
73. Devereux HL, Youle M, Johnson MA, *et al.* *Rapid decline in detectability of HIV-1 drug resistance mutations after stopping therapy.* AIDS 13: F123–127, 1999.
74. Verhofstede C, Van Wanseele FV, Van Der Gucht B, *et al.* *Interruption of reverse transcriptase inhibitors or a switch from reverse transcriptase to protease inhibitors results in a fast reappearance of virus strains with a reverse transcriptase inhibitor-sensitive genotype.* AIDS 13 : 2541–2546, 1999.
75. Lambotte O, Chaix ML, Gubler B, *et al.* *The lymphocyte HIV reservoir in patients on long-term HAART is a memory of virus evolution.* AIDS 18: 1147–1158, 2004.

76. Verhofstede C, Noë A, Demecheleer E, *et al.* *Drug-resistant variants that evolve during non-suppressive therapy persist in HIV-1-infected peripheral blood mononuclear cells after long-term highly active antiretroviral therapy.* Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes 35: 473–483, 2004.
77. Ibanez A., Puig T., Elias J., Clotet B., Ruiz L., Martinez MA. *Quantification of integrated and total HIV-1 DNA after long-term highly active antiretroviral therapy in HIV1-infected patients.* AIDS 13: 1045-1049, 1999.
78. Gendelman HE. *et. al.* *The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection.* AIDS. 3(8):475-495, 1989.
79. Zazzi M, Romano L, Catucci M, Venturi G, De Milito A, Almi P, Gonnelli A, Rubino M, Occhini U, Valensin PE. *Evaluation of the presence of 2-LTR HIV-1 unintegrated DNA as a simple molecular predictor of disease progression.* J Med Virol. 52(1): 20-5, 1997.
80. McDermott JL. *et al.* *Decay of human immunodeficiency virus type 1 unintegrated DNA containing two long terminal repeats in infected individuals after 3 to 8 years of sustained control of viremia.* J. Clin. Microbiol. 43(10): 5272-5274, 2005.
81. Sharkey ME *et. al.* *Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy.* Nat Med. 6(1): 76-81, 2000.
82. Sharkey M., Triques K., Kuritzkes DR., Stevenson M. *In vivo evidence for instability of episomal human immunodeficiency virus type 1 cDNA.* J. of Virol: 5203-5210, 2005.
83. Teo I, Veryard C, Barnes H, An SF, Jones M, Lantos PL, Luthert P, Shaunak S. *Circular forms of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA and high levels of viral protein expression: association with dementia and multinucleated giant cells in the brains of patients with AIDS.* J. Virol. 71(4):2928-2933, 1997.
84. Donovan RM., *et. al.* *Rapid decrease in unintegrated human immunodeficiency virus DNA after the initiation of nucleoside therapy.* J Infect Dis. 170 (1):202-205, 1994.
85. Donovan RM., Bush CE., Smereck SM., Moore E., Cohen F., Saravolatz LD. *Antiretroviral therapy is associated with a decrease in unintegrated HIV-1 DNA in pediatric patients.* J Acquir Immune Defic Syndr. 7(12):1237-1241, 1994.
86. Bush CE, Donovan RM, Manzor O, Baxa D, Moore E, Cohen F, Saravolatz LD. *Comparison of HIV type 1 RNA plasma viremia, p24 antigenemia, and unintegrated DNA as viral load markers in pediatric patients.* AIDS Res. Hum. Retroviruses. 12(1): 11-15, 1996.
87. Pauza CD, Trivedi P, McKechnie TS, Richman DD, Graziano FM. *2-LTR circular viral DNA as a marker for human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo.* Virology. 205(2):470-478, 1994.
88. Sharkey ME., Stevenson M. *Two long terminal repeat circles and persistent HIV-1 replication.* Current opinion in Infectious Disease 14: 5-11, 2001.
89. Jordan A., Bisgroove D., Verdin E. *HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro.* The EMBO Journal 22: 1868- 1877, 2003.

- 90.** Hauber I, Harrer T, Low P, Schmitt M, Schwingel E, Hauber J. *Determination of HIV-1 circular DNA as a surrogate marker for residual virus replication in patients with undetectable virus loads.* AIDS. 14(16): 2619-2621, 2000.
- 91.** Kostrikis LG. *et. al. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA forms with the second template switch in peripheral blood cells predicts disease progression independently of plasma RNA load.* J Virol. 76(20): 10099-100108, 2002.
- 92.** Gibellini D., Vitone F., Schiavone P., Ponti C., La Placa M., Re M.C. *Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells by SYBR Green real-time PCR technique.* J. of Clin. Virol. 21: 187-196, 2003.
- 93.** Clementi M., Menzo S., Bagnarelli P., et al. *Clinical use of quantitative molecular methods in studying human immunodeficiency virus type 1 infection.* Clin. Microbiol. Rev. 9: 135-147, 1996.
- 94.** Gibellini D., Vitone F., Gori E., La Placa M., Re M.C. *Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load by SYBR Green real-time RT-PCR technique in HIV-1 seropositive patients.* J. Virol. Meth. 2003 .
- 95.** Belleste B., Flori P., Hafid J., Raberin H., Tran Mahn Sung R. *Influence of the quantity of non-specific DNA and repeated freezing and thawing of samples on the quantification of DNA by the Light Cycler ®.* Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP), Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, 15 rue Ambroise Pare, 42023, Saint Etienne, France.
- 96.** Wilhelm J. *et. al. Real-time polymerase chain reaction.* Chembiochem 4: 1120- 1148, 2003.
- 97.** Nathalie D., Axelle D., et al. *Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral Load by a TaqMan Real-Time PCR Assay.* J. of Clinical Microbiology 39, 1303-1310, 2001.
- 98.** Yilmaz G. *Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy.* J. Clin. Virol. 21: 187-196, 2001.
- 99.** Pomerantz RJ *Reservoirs of human immunodeficiency virus type 1: the main obstacles to viral eradication.* Clin Infect Dis. 34(1):91-7, 2002.
- 100.** Havlir D., Bassett R., Levitan D., Gilbert P., Tebas P., Collier A.C., Hirsch M.S., Ignacio C., Condra J., Gunthard H.F., Richman D.D., Wong J.K. *Prevalence and predictive value of intermittent viraemia with combination HIV therapy.* JAMA. 11; 286 (2): 224-226, 2001.
- 101.** Finzi D., Hermankova M., Pierson T., Carruth L.M., Buck C., Chaisson R.E., Quinn T.C., Chadwick K., Margolick J., Brookmeyer R., Gallant J., Markowitz M., Ho D.D., Richman D.D., Siciliano R:F. *Identification of a reservoir HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy.* Science 14, 278 (5341): 1127, 1997.
- 102.** Rouzioux C., Hubert JB. and Meyer L. *Early levels of HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells are predictive of disease progression independently of HIV-1 RNA levels and CD4+ T cell counts.* Journal of Infect. Dis. 192: 46-55, 2005.

103. Sarmati L., Parisi SG., Nicastrì E. and Andreoni M. *Association between cellular HIV DNA level and immunological parameters in patients with undetectable plasma viremia level during highly active antiretroviral therapy.* J. of Clin. Microb. 43: 6183-6185, 2005.

104. Chun T.W., Stuyver L., Mizell S.B., Ehler L.A., Mican J.A., Baseler M., Lloyd A.L., Nowak M.A., Fauci A.S. *Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13193-13207, 1997.

105. Ramratnam B., Mittler J., Zhang L., Boden D., Hurley A., Fang F., Macken C.A., Perelson A.S., Markowitz M., Ho D.D. *The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged antiretroviral therapy.* Nature Med. 6: 82-85, 2000.

106. Rosenberg E.S., Altfeld M., Poon S.H., Phillips M.N., Wilkes B.M., Eldridge R.L., Robbins G.K., D'Aquila R.T., Goulder P.J., Walker B.D. *Immune control of HIV-1 after treatment of acute infection.* Nature, 407: 523-526, 2000.

107. Goujard C *et.al.* *CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients .* Clin Infect Dis. 42(5):709-715, 2006.

108. Morlese J., Teo IA., Shaunak S. *Identification of two mutually exclusive groups after long-term monitoring of HIV DNA 2LTR circle copy number in patients on HAART.* AIDS 17: 679-683, 2003.

109. Programma Trapianto di fegato da donatore cadavere in soggetti HIV positivi vers 2004.

110. Eyster ME, Diamondstone LS, Lien JM et al *Natural history of hepatitis C virus infection in multitransfused hemophiliacs: effect of coinfection with human immunodeficiency virus.* J Acquir Immune Defic Syndr. 1993 Jun; 6(6):602-10.

111. Sulkowski MS, Thomas DL, Chaisson RE et al: *Hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy in adults infected with human immunodeficiency virus and the role of hepatitis C or B virus infection.* JAMA 2000 Jan 5;283(1):74-80.

SITI INTERNET CONSULTATI:

www.avert.org/virus.htm

www.medicinenet.com

www.aidsinfo.nih.gov

www.aids.med.unibo.it

www.thebody.com

www.cdc.gov/hiv

www.ministerosalute.it/aids

www.roche-applied-science.com/lightcyclers

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.aids.org

