

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE**

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/A3 Microbiologia e Microbiologia Clinica

Settore Scientifico disciplinare: MED/07 Microbiologia e Microbiologia Clinica

**HIV E TERAPIA ANTIRETROVIRALE:
EFFETTI SULLA DENSITÀ DI MASSA OSSEA IN
SOGGETTI SIEROPOSITIVI
E STRATEGIE PREVENTIVE INNOVATIVE**

Presentata da: Dott.ssa Giuseppina Musumeci

Coordinatore Dottorato


Chiar.mo Prof. Lucio Cocco

Relatore


Chiar.ma Prof. Maria Carla Re

Esame finale anno 2016

INTRODUZIONE	1
HIV	3
Caratteristiche generali	3
Struttura	4
Sottotipi di HIV	6
Genoma virale.....	7
Proteoma virale	8
Il ciclo replicativo	14
Penetrazione: legame a CD4 e interazione con i co-recettori.....	15
Fusione della membrana, retrotrascrizione ed import nucleare.....	17
Integrazione	18
Trascrizione: funzione di Tat.....	19
Export dell'RNA: funzione di Rev.....	19
Produzione di particelle virali.....	20
Legame di Gag alla membrana e trageting.....	20
Incapsidazione dell'RNA.....	20
Assemblaggio.....	21
Trasporto di Env e incorporazione	21
Budding.....	22
Maturazione	22
Il processo infettivo <i>in vivo</i>	23
Evoluzione clinica.....	23
Patogenesi dell'immunosoppressione.....	26
Diagnosi	28
Epidemiologia.....	29
Fattori che influenzano il ciclo dell'infezione da HIV.....	30
Immunodeficienza.....	30
Risposta immunitaria anti-HIV dell'ospite	31
Resistenza del virus alla risposta immune	31
Terapia antiretrovirale	31
Principali farmaci antivirali	32
HAART	38

Insorgenza di resistenze.....	39
Strategie preventive innovative: microbicidi.....	40
TESSUTO OSSEO.....	43
Organizzazione macroscopica delle ossa lamellari.....	44
Istofisiologia dell'osso	45
Componente cellulare del tessuto osseo	46
Osteoblasti	46
Osteociti	47
Osteoclasti.....	48
Rimodellamento osseo	48
Fasi del rimodellamento osseo	49
HIV E METABOLISMO OSSEO	51
Osteoblasti: ruolo del virus.....	52
Osteoblasti: ruolo dei farmaci.....	53
OBIETTIVO DELLA TESI	55
MATERIALI E METODI	58
Isolamento PBMCs e monociti da donatori sani	58
Trattamento dei monociti di soggetti sani con la proteina Tat di HIV-1	58
Trattamento dei monociti di soggetti sani con surnatanti ottenuti da colture cellulari di soggetti sieropositivi	59
Analisi espressione genica	60
OsteoMODAT.....	60
Calcolo BMD e quantificazione marker ossei.....	61
Colture cellulari e preparazione stock virali	61
Sintesi del composto M48U1, del Tenofovir e del gel HEC	62
Infezione e trattamento antiretrovirale	63

Analisi effetti dei farmaci su un modello di cellule cervico- vaginali.....	63
Analisi potere citotossico e infiammatorio su cellule cervico- vaginali.....	64
Analisi statistiche	65
RISULTATI	66
Tat induce un aumento dei marker ossei analizzati	66
La terapia antiretrovirale intensifica il differenziamento osteoclastico.....	68
I livelli quantitativi di RANKL al baseline correlano con la variazione della BMD	71
M48U1 e Tenofovir inibiscono l'infezione di ceppi di HIV-1 X4 e R5 tropici nei PBMCs.....	72
M48U1 e Tenofovir inibiscono l'infezione di ceppi di riferimento di HIV-1 e di isolati da pazienti.....	75
Effetto sinergico di M48U1 e Tenofovir in HEC 0,25% sull'inibizione di HIV-1	76
M48U1 e Tenofovir inibiscono la replicazione di HIV-1 in cellule cervico-vaginali.....	77
BIBLIOGRAFIA.....	85

INTRODUZIONE

Nel 1980-81, la segnalazione di focolai di polmonite mortale da *Pneumocystis carinii* associata a segni evidenti di compromissione del sistema immunitario, in giovani adulti, per lo più maschi omosessuali (“*gay pneumonia*”) portò, negli USA, alla identificazione della AIDS, sindrome da immunodeficienza umana acquisita, ed al sospetto che un agente infettante, a trasmissione sessuale, potesse esserne la causa.

Nel 1984 fu identificato un retrovirus quale agente causale dell’AIDS in tre differenti laboratori. Il virus fu chiamato HTLV-III (Human T-lymphotropic virus type III) al National Cancer Institute di Bethesda, LAV (Lymphadenopathy- associated virus) all’Istituto Pasteur di Parigi e ARV (AIDS-related virus) all’Università di San Francisco in California. Dopo vivaci discussioni una commissione internazionale adottò il nome HIV (human immunodeficiency virus). Nel 1985, sono stati resi disponibili i primi reattivi per la ricerca degli specifici anticorpi (a scopo diagnostico e per il relativo “screening” dei donatori di sangue).

Il numero di persone che vivono con l’HIV è cresciuto dai circa 8 milioni del 1990 a circa 37 milioni nel 2014, ed è ancora in crescita. Quasi i 2/3 delle persone che vivono con l’HIV si trovano nell’Africa Sub-Sahariana.

Il grafico sotto riporta l’andamento storico della popolazione affetta a HIV:

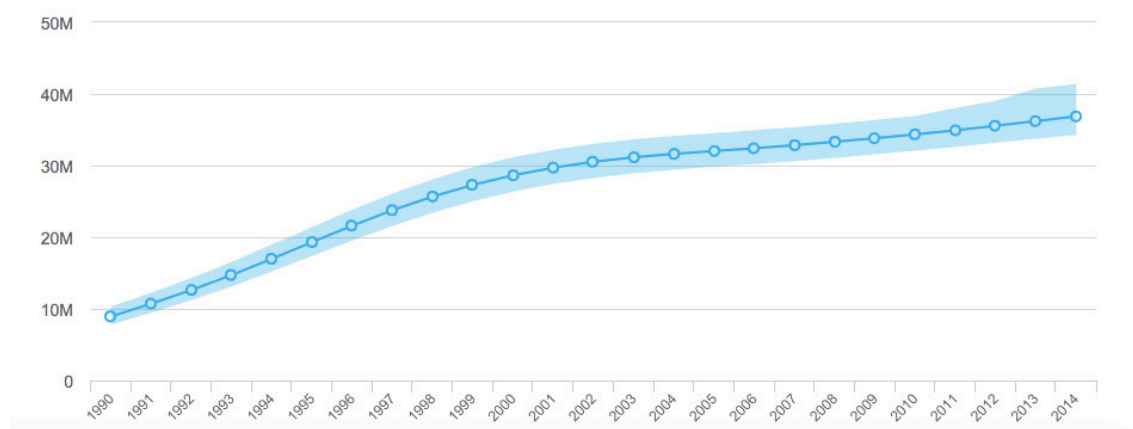


GRAFICO 1: andamento storico popolazione affetta da HIV (fonte UNAIDS)

HIV viene trasmesso per via parenterale e/o per via parenterale inapparente, cioè attraverso microlesioni difficilmente individuabili della cute e/o delle mucose. A oggi, le vie di trasmissione maggiormente rappresentative sono quella sessuale e quella ematica (trasfusioni di sangue e/o somministrazione di emoderivati infetti), ma nei paesi in via di sviluppo la via di trasmissione principale rimane quella verticale; questa può avvenire sia durante la gravidanza per passaggio trans-placentare, sia durante il parto e infine durante l'allattamento.

Oggi sono due i virus responsabili della AIDS: HIV-1 e HIV-2. HIV-1 è diffuso in tutto il mondo ed è responsabile della maggior parte dei casi di AIDS; HIV-2 è presente soprattutto in Africa occidentale, nei Caraibi e nell'America meridionale, è meno virulento e provoca una malattia a decorso relativamente più attenuato.

HIV

Caratteristiche generali

HIV-1 appartiene alla famiglia dei *Retroviridae*, formata da virus provvisti di un involucro pericapsidico, il cui genoma, in modo assolutamente peculiare, è rappresentato da due molecole identiche (sono gli unici virus con genoma diploide) di RNA con polarità positiva, che prima della traduzione, sono retro-trascritte, ad opera di una DNA polimerasi RNA-dipendente (trascrittasi inversa) presente nel virione, in molecole di DNA bicitenario che si integrano nel genoma della cellula ospite (sottoforma di provirus), dove vengono poi trascritte ad opera della RNA polimerasi II della cellula. Altra caratteristica peculiare dei lentivirus, genere dei *Retroviridae* cui appartiene HIV-1, che li distingue dagli altri retrovirus, è la capacità di infettare alcuni citotipi in fase *resting*.

In base alle differenze nelle sequenze genomiche e nelle diverse proteine codificate, al diverso spettro d'ospite, alla differenza nella composizione antigenica e nella patogenicità, i virus della famiglia *Retroviridae* sono classificati in sottofamiglie:

- *Alpharetrovirus*, con morfologia C, interessano volatili e pollame domestico.
- *Betaretrovirus*, cui appartengono virus esogeni ed endogeni con morfologia di tipo B nei topi e di tipo D nei primati e nelle pecore; il più noto è il virus del tumore alla mammella nel topo.
- *Gammaretrovirus*, che rappresentano gli agenti eziologici di leucemie e sarcomi in mammiferi, volatili e rettili.
- *Deltaretrovirus*, che sono virus in grado di sviluppare leucemie, linfomi e sarcomi in molti animali perché dotati di geni che regolano, direttamente o indirettamente, la proliferazione cellulare; appartengono a questa sottofamiglia i virus HTLV-1 e HTLV-2 (Human T-cell Leukemia Virus).
- *Epsilonretrovirus*, evidenziati nei pesci.
- *Lentivirus*, che sono agenti eziologici di disordini degenerativi del sistema immunitario caratterizzati da una progressione molto lenta; fanno parte di questa sottofamiglia HIV con entrambi i suoi sottotipi HIV-1 e HIV-2.

- *Spumavirus*, che prendono il nome dal particolare effetto citopatico che, oltre alla formazione di sincizi, vede un'estesa vacuolizzazione citoplasmatica a dare, alle cellule che ne sostengono la replicazione, un aspetto appunto spumoso; nonostante siano stati i primi retrovirus umani a essere isolati, a tutt'oggi non sono ancora associati a nessuna malattia umana (recentemente, però, è stata riscontrata in Africa la presenza di anticorpi specifici per alcuni spumavirus delle scimmie, in soggetti dediti alla caccia e macellazione delle scimmie, ipotizzando il rischio di una nuova infezione retro virale). Recentemente a queste sottofamiglie sono stati affiancati i retrovirus endogeni, costituiti da sequenze integrate stabilmente nel genoma della cellula ospite.

Struttura

Al microscopio elettronico il virione di HIV appare come una particella sferica di 100-120 nm di diametro, e presenta un capsid di forma tronco-conica (FIG.1).

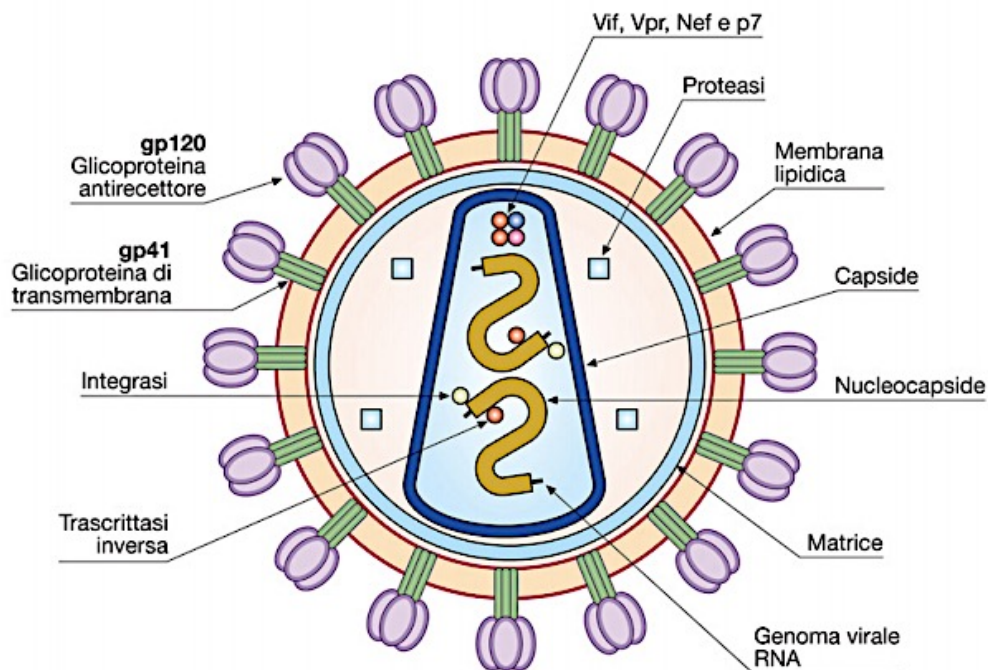


Figura 1: Struttura di HIV

All'esterno è presente l'involucro pericapsidico, acquisito dal virus durante la gemmazione dalla superficie esterna della cellula infetta, costituito da un doppio strato fosfolipidico che mantiene alcune delle proteine cellulari di superficie, come ad esempio i complessi maggiori di istocompatibilità (MHC) di classe I e II (Harrison et al., 2005). Oltre a queste strutture, sono presenti anche proteine virali necessarie per il contatto e la penetrazione all'interno della cellula ospite, la glicoproteina (gp) 120 e la gp41, prodotte per azione della proteasi cellulare sulla gp160 codificata dal gene virale *env*.

La gp120 protrude dalla superficie dell'envelope (per questo la sua localizzazione è nota anche come SU) ed è associata, tramite interazioni idrofobiche (Colamn et al., 2003) a livello delle regioni N- e C- terminale, con le regioni centrali della gp41, che funge quindi da ancoraggio al bilayer lipidico, grazie al suo dominio transmembrana (TM).

L'interazione tra queste due proteine porta alla formazione di esameri, chiamati *spikes*, costituiti da tre molecole di gp41 all'interno dell'involucro pericapsidico, sovrastate da tre molecole di gp120. Per la formazione del virione è necessaria un'altra proteina, la p17 o MA da matrice, prodotto genico di gag, che forma uno strato continuo di 7nm (matrice), interposto tra l'envelope e il nucleocapside. La sua localizzazione nella membrana cellulare, è dovuta a due cause principali: la presenza di un residuo di acido miristilico nella regione N-terminale e la presenza di alcuni residui basici nei primi 50 amminoacidi. La prima è una modifica post-traduzionale che ne garantisce l'ancoraggio alla membrana, che è ulteriormente stabilizzato dalle interazioni elettrostatiche tra i gruppi fosfato del bilayer lipidico, carichi negativamente, e le catene amminoacidi che basiche, cariche positivamente (Bukrinskava et al., 2004).

E' presente un altro prodotto genico di *gag*, la proteina p24 o CA da capsid, che costituisce il core virale, all'interno del quale troviamo il materiale genetico complessato con le proteine p7 e p9 o NC da nucleo capsid, e tutte quelle molecole indispensabili allo svolgimento delle prime fasi del ciclo virale: due tRNA che fungeranno da primers, la trascrittasi inversa, l'integrasi e la proteasi.

Sottotipi di HIV

Le infezioni da HIV sono caratterizzate dall'appartenenza a sottotipi (*clades*), che rimandano a varianti che sono geneticamente correlate tra loro, spesso raggruppabili in regioni geografiche a causa dell'effetto fondatore (Ellis et al., 2009).

La diversità genetica che caratterizza HIV ha giocato un ruolo fondamentale nella sua espansione a livello mondiale. Questo crea maggiore interesse riguardo la progressione della malattia, la sua diagnosi, trattamento e prevenzione (Hemelaar et al., 2006). Gli esperimenti condotti in occidente derivano principalmente dall'utilizzo del clade B di HIV-1 che infetta la popolazione caucasica, pertanto non può essere generalizzato per tutti i clades di HIV e per l'intera popolazione mondiale. Il clade B di HIV-1 è causa solo del 10% delle infezioni totali ed è predominante nell'Europa Occidentale, Australia e nelle Americhe (McCutchan et al., 2006). Negli Stati Uniti il clade B di HIV rappresenta la maggioranza delle infezioni (~98%) con un minimo contributo da parte degli altri clades (Hemelaar et al., 2006). Tuttavia nell'Africa Sub-sahariana, la regione più colpita dall'epidemia di HIV, il clade C di HIV-1 è il più comune, con circa il 50% delle infezioni a suo carico. In altre regioni fortemente colpite dall'epidemia di HIV, come il Sud e Sud-Est asiatico, il sottotipo predominante è il clade AE. Nell'Europa dell'Est, Russia e altre popolose aree dell'Asia dove si sta rapidamente diffondendo l'epidemia, il 79% delle infezioni è causato dal clade A di HIV (Hemelaar et al., 2006). Gli effetti dei sottotipi sull'avanzamento della malattia e il suo trattamento non sono ancora stati chiariti. Ciò nonostante vari studi rivelano che inibitori della trascrittasi inversa e della proteasi hanno la stessa efficienza nel trattamento di tutti i sottotipi di HIV (McCutchan et al., 2006 Alexander et al., 2002), altri studi affermano che diversi sottotipi di HIV sono più efficienti nello sviluppare resistenza ai farmaci antiretrovirali, oltre a presentare una minore sensibilità agli stessi farmaci (Pillay et al., 2002).

Genoma virale

Il genoma di HIV ha nove geni distinti: tre codificano per le poliproteine Gag, Pol, Env, i fattori strutturali ed enzimatici fondamentali, comuni a tutti i retrovirus; due geni per le proteine a funzione regolatoria: Tat e Rev; quattro sequenze per le proteine accessorie: Nef, Vif, Vpr e Vpu (Frankel et al., 1998) E' costituito da due filamenti di RNA con polarità positiva monocatenario della lunghezza di circa 9,8 kb (FIG.2).

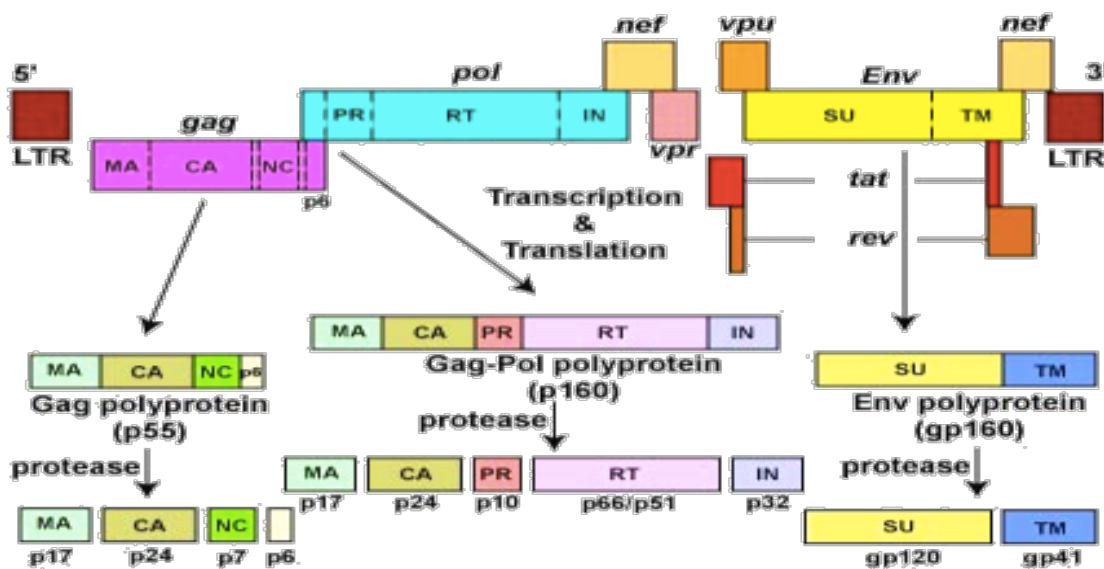


Figura 2: Rappresentazione del genoma di HIV

Ciascuno dei due filamenti possiede una regione per l'appaiamento nella regione al 5', che consente la formazione di una struttura duplex e favorisce il loro inserimento nel capsido al momento dell'assemblaggio. Questa regione al 5' è denominata ψ (psi) ed è formata da quattro α -elicche che interagiscono con la proteina nucleocapsidica (NC) e i suoi due motivi a dita di zinco (Frankel et al., 1998 De Guzman et al., 1998)

All'estremità 5' è presente anche un *capping* di residui di guanosina fosforilata e metilata e il *primer binding site* per la cattura del tRNA che fungerà da primer per la retrotrascrizione. L'estremità 3', invece, è libera e poliadenilata.

Alla fine di ciascun filamento sono presenti delle sequenze ripetute dirette (segmenti R), seguite internamente da due regioni: U5, all'estremità 5' e U3 all'estremità 3'.

Durante il completamento della retrotrascrizione del genoma di HIV avvengono due eventi di appaiamento fra i segmenti R: la peculiare modalità di processazione fa sì che il filamento di DNA formatosi presenti ai propri estremi due sequenze identiche composte dai segmenti U5, R, U3, denominate *Long Terminal Repeats* (LTRs). Sono delle sequenze non codificanti ma fondamentali per la trascrizione, e quindi per la replicazione, perché contengono sequenze *enhancer* atte a legare molti fattori di trascrizione e il segnale di poliadenilazione.

In base alle diverse funzioni, le LTRs possono essere distinte in quattro regioni:

- un elemento transattivante (TAR), all'interno del segmento R;
- il promotore principale che contiene il sito iniziatore Inr, la sequenza TATA-box e i tre siti di legame per SP1;
- un sito *enhancer* che è in grado di legare i fattori NF-kB (*Nuclear Factor-kB*), NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*), AP-1 e alcuni membri della famiglia Ets (Peterlin et al., 2003) ;
- una regione di modulazione, nella regione U3;

L'attivazione del promotore e del sito *enhancer* garantisce un elevato tasso di trascrizione del genoma virale, sia in cellule T attivate, sia nei macrofagi, ma comunque non è sufficiente per assicurare la produzione di trascritti completi. Per aumentare la processività della RNA polimerasi, permettendo l'allungamento e la terminazione dei trascritti in modo appropriato, il virus produce la proteina Tat che si lega alla sequenza TAR dei messaggeri nascenti.

Proteoma virale

Il genoma di HIV contiene nove *open reading frames* (ORFs). I geni Gag, Pol ed Env, sono tradotti in poliproteine (Gag, Gag-Pol, o semplicemente Pol, e Env) che vengono poi scisse nelle proteine funzionali definitive che si assemblano, insieme alle due molecole di RNA genomico nel virione completo.

La **poliproteina Gag** deriva dalla traduzione del messaggero che va dal codone d'inizio fino al primo codone di terminazione, ha un peso molecolare di 55 KDa e la sua sintesi è sufficiente per l'assemblaggio di particelle virali anche in assenza di RNA. Dopo la formazione del virione, questo precursore è digerito dalla proteasi virale e dà origine, a partire dall'estremità N terminale, alla proteina di matrice p17 (MA), alla proteina capsidica p24 (CA), al peptide spaziatore p2, alla proteina del nucleocapside p7 (NC), al peptide spaziatore p1 e alla proteina p6. La proteina di matrice (MA), è coinvolta nell'indirizzamento alla membrana della poliproteine Gag e Gag-Pol, nell'incorporazione della glicoproteina Env e negli eventi immediatamente successivi all'entrata del virione nella cellula ospite (Freed et al., 1998). I risultati degli studi cristallografici hanno dimostrato che spazialmente la poliproteina polimerizza formando un omotrimerico, che rappresenta la struttura biologicamente attiva della p17 (Cannon et al., 1997 Hill et al., 1996).

L'affinità della **MA** per le membrane cellulari dipende dalla modifica in fase post-traduzionale che comporta l'attacco di una molecola di acido mirilistico nella regione N-terminale del peptide, coadiuvato dalla presenza di alcuni residui basici che assumono carica positiva ed interagiscono con le membrane, cariche negativamente.

La **p17** contiene due segnali di localizzazione nucleare (NLS), la cui delezione comporta una diminuzione dell'efficienza del trasporto del complesso di pre-integrazione (PIC) al nucleo, inficiando anche la capacità di replicazione del virus (Haffar et al., 2000).

Il secondo prodotto della poliproteina Gag è la proteina del capsidico (**CA**), la quale forma l'involucro che racchiude il genoma virale e tutte le proteine che vi sono associate.

La terza proteina derivante dal clivaggio della poliproteina Gag è la proteina del nucleocapsidico (**NC**) che presenta due sequenze Cys-X-Cys-X-Hys-X-Cys (CXCXHC), analoghe alle sequenze degli zinc fingers cellulari, che le consentono di legare acidi nucleici a doppio filamento (Summers et al., 1992).

La proteina p6 comprende i 57 residui C-terminali della poliproteina Gag ed è responsabile dell'incorporazione di Vpr durante l'assemblaggio.

La **poliproteina Pol** deriva dalla traduzione del messaggero che va dal codone d'inizio fino al secondo codone di terminazione; il superamento del primo codone di terminazione può avvenire o per soppressione, se non vi è cambiamento della chiave di lettura tra i *frames* dei due geni, oppure per slittamento del ribosoma. Il meccanismo di antiterminazione avviene, comunque, con una frequenza molto bassa (5%), per cui la poliproteina Gag si trova in quantità di circa 20 volte superiore rispetto alla poliproteina Pol. Da questo precursore hanno origine tre enzimi virali: integrasi, proteasi e retrotrascrittasi, che sono tutti inclusi nel virione in fase di assemblaggio.

La **retrotrascrittasi (RT)** è l'enzima caratteristico dei retrovirus e catalizza la sintesi (retrotrascrizione) dell'intermedio a DNA necessario per la loro replicazione. La RT di HIV è un eterodimero formato da due subunità p51 e p66, entrambe componenti della poliproteina Gag-Pol. Ciascun monomero possiede un dominio con attività polimerasica RNA dipendente, anche se in p51 i sub domini sono ripiegati e quindi cataliticamente inattivi. Nel monomero p66 c'è un dominio aggiuntivo, analogo alle RNasi di tipo H, che digeriscono il filamento di RNA durante il processo di retrotrascrizione (Rogers et al., 1995 Wang et al., 1994).

Il cDNA prodotto dalla retrotrascrizione è, in seguito, inserito nel genoma cellulare grazie all'**integrasi**, una proteina attiva come tetramero in cui ciascun monomero è formato da tre domini funzionalmente distinti, connessi da un breve loop flessibile costituito dal core, sede dell'attività catalitica, il dominio N-terminale a dita di zinco e il dominio C-terminale che lega il DNA. Nel dominio N-terminale è presente un motivo Hys-Hys-Cys-Cys (H-H-C-C) che lega gli ioni zinco, permettendo il legame, tramite questa porzione dell'enzima, tra il DNA e il complesso d'integrazione; poiché la delezione di tale dominio non inficia la dis-integrazione, è stato ipotizzato un coinvolgimento nell'interazione proteina-proteina e quindi nella multimerizzazione. Il core della proteina ha un ripiegamento analogo a quello delle RNasi H. Il dominio C-terminale, il meno conservato fra le integrasi retrovirali, lega il DNA specificamente ed è coinvolto nell'interazione tra proteine quindi sia nella dimerizzazione che nel contatto con la retrotrascrittasi (Wielens et al., 2005).

La formazione della **poliproteina Env** dipende dalla produzione di un RNA messaggero più breve, che origina da *splicing* alternativo. Le proteine dell'envelope, **gp120** (superficie) e **gp41** (transmembrana), responsabili del contatto e della penetrazione di HIV nelle cellule bersaglio, hanno origine dal precursore Env, grazie ad un taglio proteolitico che, a differenza della altre due poliproteine, avviene ad opera di una proteasi cellulare, a livello del reticolo endoplasmatico. In particolare, gp41 contiene tre domini: un ectodominio, che catalizza la fusione delle membrane virali e della cellula ospite durante la penetrazione; l'ancora transmembrana e una coda che sporge nel citoplasma. La gp120 presenta 5 regioni conservate (C1, C2, C3, C4, C5) e 5 regioni altamente variabili (V1, V2, V3, V4, V5). Queste due proteine sono successivamente glicosilate, seguendo la normale via di maturazione cellulare, inserite nella membrana plasmatica e infine incorporate nel virione per interazione con MA. *In vivo*, gp120 e gp41 polimerizzano per formare i caratteristici *spikes* presenti sull'envelope virale che mediano il legame tra il virus e i recettori cellulari. Gli *spikes* sono costituiti da tre gp41 inserite, appunto, nell'involucro pericapsidico e sovrastate da altrettante gp120, mantenute in tale posizione da legami non covalenti piuttosto labili. Una precisa successione di contatti tra virus e cellula determinano importanti cambiamenti conformazionali delle proteine coinvolte, fino alla fusione delle membrane e all'entrata di HIV nella cellula. Se le proprietà di fusione della struttura macromolecolare degli *spikes* risiedono in gp41, gp120 è deputata alla presa di contatto con entrambi i recettori cellulari, sia primario sia secondario. In particolare è l'ansa variabile V3 di gp120 che, esposta a seguito del legame con il recettore primario o CD4, protrude spazialmente e va a interagire elettrostaticamente con i primi due *loops* extracellulari del recettore secondario (Huang et al., 2005). Si può allora affermare che l'ansa V3 determini il tropismo cellulare del virus.

La glicoproteina virale gp120 è inoltre considerata il più potente induttore apoptotico fra le proteine di HIV e, anche nella sua forma solubile, è in grado di indurre l'apoptosi di cellule non infette, quali linfociti T naïve e di memoria.

Proprio questa sua capacità sarebbe una causa importante della progressiva perdita delle funzioni immunitarie che caratterizza l'infezione da HIV.

Oltre a Gag, Pol ed Env, il genoma di HIV-1 contiene altre sei sequenze che codificano le **proteine regolatrici** Tat e Rev, e le **proteine accessorie** Vpr, Nef, Vif e Vpu.

La prima proteina regolatoria, **Tat** (*transactivator of transcription*), ha una lunghezza variabile tra 86-102 aa, con un peso molecolare variabile tra 14 e 16 kDa. E' prodotta ad alti livelli da cellule infette ed esiste una correlazione tra alti livelli di replicazione virale e alti livelli di sintesi Tat. Viene sintetizzata nelle prime fasi della replicazione (*early*) a partire da due esoni presenti all'estremità 3' del genoma virale e svolge una funzione essenziale nella replicazione virale: lega l'elemento TAR (*Transactivation Response Element*) e la particolare struttura a *stem-loop* inducendo così l'associazione del complesso proteico cellulare *Positive Transcription Elongation Factor b* (P-TEFb). Entra a far parte di questa struttura macromolecolare anche la chinasi ciclina dipendente 9 (Cdk9) che, fosforilando l'estremità terminale della RNA polimerasi II, aumenta la processività e favorisce, quindi, la formazione di trascritti completi. Contemporaneamente, Tat aumenta il tasso d'inizio della trascrizione agendo come modulatore dell'attività delle acetil-transferasi cellulari con conseguente acetilazione istonica favorevole all'attivazione del promotore (Strebel et al., 2003). Tat è una molecola pleiotropica con effetti tipo citochina, infatti, oltre agli effetti suddetti, regola l'attività di molteplici promotori cellulari, la sopravvivenza e la proliferazione della cellula (Barillari et al., 1996).

Tat può anche essere secreta da cellule infettate in modo produttivo, manifestando numerosi effetti di tipo paracrino non direttamente connessi alla replicazione virale; è infatti, in grado di entrare nelle cellule bersaglio e di indurre i propri effetti (Ferrari et al., 2003; Zheng et al., 2005). Studi di mutagenesi sito-specifica hanno identificato nei residui 48-60 del dominio N-terminale (*protein transduction domain, PTD*) la sede funzionale dell'internalizzazione delle cellule (Zheng et al., 2005). Sulla membrana cellulare sono presenti i proteoglicani eparan-solfati, che fungono da recettori a bassa affinità per Tat extracellulare (Tyagi et al., 2001). Risultano, quindi, anche coinvolte, cellule non infette (Romani et al., 2010), in cui può essere indotta la trascrizione di alcuni geni e si può avere una modulazione delle vie di trasduzione del segnale fino all'induzione o inibizione di apoptosi (Pugliese et al., 2005). Tat può regolare l'espressione di diversi geni cellulari, in due modi: tramite un effetto diretto sulla regolazione della trascrizione dello specifico mRNA, oppure, indirettamente, tramite l'attivazione di vie di trasduzione del segnale, che avviene in seguito al legame di Tat con diversi recettori cellulari quali VEGFR-1 e VEGFR-2, eparan-solfati ed integrine (Albini et al., 1996; Mitola et al., 1997). In base alla concentrazione di Tat e al tipo

cellulare, Tat ha come effetto una modulazione di diverse risposte biologiche (Barillari et al., 2002); in particolare, Tat induce l'attivazione di geni di numerose citochine, tra cui IL-6, TNF- α e TGF- β 1, nel midollo osseo, nei monociti e nei macrofagi (Buonaguro et al., 1992 Gibellini et al., 1994), dimostrando un'azione di Tat sulla regolazione biologica cellulare e sulla sua evoluzione dell'infezione, che ha determinato un interesse da parte dei ricercatori nel considerare Tat come un target vaccinale.

L'altra proteina regolatoria è **Rev** (*Regulatori of virus expression*), che subito dopo la sua produzione, è trasportata al nucleo tramite il legame con l'importina β . Svolge un ruolo regolatorio sui messaggeri virali.

Tra le proteine accessorie troviamo **Vpr** il cui nome deriva da *Viral Protein R*, una proteina di 96 aa, dal peso molecolare di 14 kDa. Partecipa al complesso di integrazione e, grazie alla presenza di un segnale di localizzazione nucleare (NLS) non convenzionale, costituito da due α -eliche anfipatiche nel dominio centrale, svolge un ruolo fondamentale di indirizzamento al nucleo (Levesque et al, 2003).

Un'altra proteina accessoria è **Nef** o *Negative factor*, che è uno dei fattori determinanti per la patogenicità di HIV, infatti la sua assenza rallenta significativamente la progressione della malattia e la sua espressione subisce pressione selettiva positiva. Si trova ancorata all'interno della membrana grazie alla miristilazione nella porzione N-terminale. L'espressione di Nef all'interno di cellule T, porta ad uno stato di attivazione generale, simile a quello tipico della risposta immune. Ha diversi effetti: favorisce l'infettività virale, regola negativamente l'espressione del CD4 e del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I) e controlla diversi meccanismi di segnalazione ed attivazione cellulare (Arora et al., 2003).

Alla classe delle proteine accessorie appartiene anche **Vif** o *Viral infectivity factor*, che è una proteina altamente conservata fra i lentivirus, perché necessaria per la replicazione in cellule non permissive o semipermissive. È una proteina basica, dal peso molecolare di 23kDa, che conferisce al virus un meccanismo di evasione delle difese cellulari in citotipi non permissivi. L'ultima proteina accessoria è **Vpu** o *Viral protein U*, una proteina di membrana, costituita da due domini: il dominio N-terminale che la ancora al *bilayer* lipidico e il dominio C-terminale che protrude nel citoplasma. La presenza di

Vpu riduce drasticamente l'emivita della molecole di CD4 poiché ne media la degradazione tramite il proteasoma, e grazie a questo, i virioni di nuova sintesi non rimangono ancorati alla cellula, riducendo la probabilità di superinfezione (Nie et al., 1998).

Il ciclo replicativo

In termini generali, il ciclo replicativo di HIV viene suddiviso in una fase precoce, che va dalla penetrazione del virus nella cellula ospite alla produzione dei messaggeri, e una fase tardiva in cui si ha la formazione del virione. Sebbene gli eventi che compongono queste fasi siano, in qualche caso, sovrapponibili dal punto di vista temporale, il ciclo replicativo si può rappresentare come una sequenza ordinata di passi necessari alla successiva infezione di cellule bersaglio (FIG. 3).

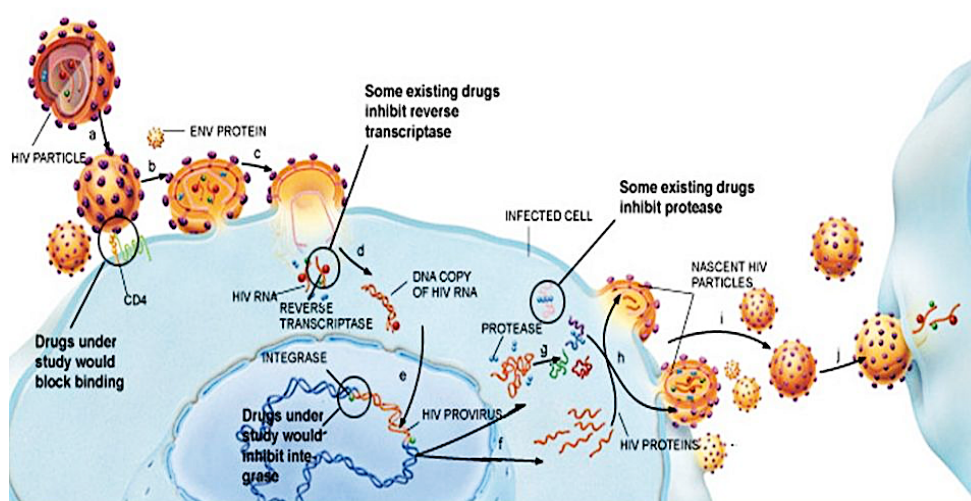


Figura 3: Ciclo replicativo di HIV-1

L'infezione da HIV avviene anzitutto tramite il legame con un recettore principale, generalmente seguito da legami con corecettori e altre molecole di adesione, in seguito avviene la fusione tra cellula e virus. Questa interazione consente al capsid di HIV di entrare nel citoplasma. Le successive fasi di retroscrittione e integrazione avvengono primariamente in cellule attivate (Zack et al., 1990).

Penetrazione: legame a CD4 e interazione con i co-recettori

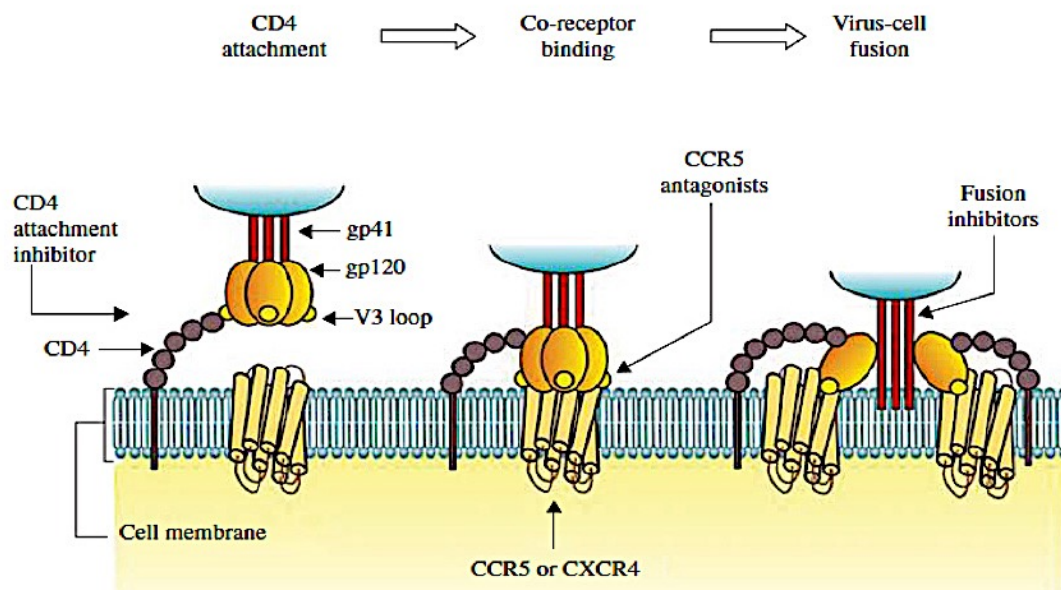


Figura 4: Fase di attacco e penetrazione virale

La penetrazione di un virus dotato di envelope all'interno di una cellula ospite avviene tramite la fusione con la membrana plasmatica o attraverso l'endocitosi. La fusione segue un modello conservato tra diverse famiglie di virus (FIG. 4): l'interazione delle proteine di superficie virali coinvolte, che sono in grado di esporre il peptide fusogeno, ovvero la porzione di proteina deputata a guidare la fusione vera e propria (Colamn et al., 2003). HIV può dare luogo all'infezione solo se la sua penetrazione nella cellula avviene tramite fusione delle membrane.

Il primo contatto tra HIV e la cellula avviene tramite l'interazione tra la gp120 e la regione C3-C4 della molecola CD4. L'alta affinità tra le gp120 e CD4 fa sì che queste due molecole restino legate anche in fase tardiva del ciclo replicativo, causando una *down-modulation* di CD4 dalla superficie cellulare e rendendo, così, le cellule infette parzialmente resistenti a un'ulteriore infezione da HIV (*superinfection interference*). Dopo la scoperta di CD4 come il maggiore recettore per HIV, è stato subito chiaro che la sola interazione tra la gp120 e CD4 non era sufficiente per la penetrazione e la fusione delle membrane ma era necessario il legame a un co-recettore: CCR5, CXCR4 o entrambi. Gli stipiti macrofago-tropici infettano monociti e macrofagi usando preferibilmente il co-recettore CCR5 e producono un fenotipo virale che, in colture cellulari *in vitro* (su cellule mononucleate di sangue periferico, le PBMCs), non induce

la formazione di sincizi, al contrario, gli stipiti T-linfo-tropici usano CXCR4 come co-recettore preferito e danno luogo ad una progenie virale con fenotipo sinciziogeno in colture di cellule. Esistono anche stipiti duo-tropici che possono usare indifferentemente i due co-recettori e possiedono, quindi, un più ampio spettro di cellule bersaglio. Sono stati inoltre identificati, come co-recettori per l'ingresso di HIV nella cellula, alcuni membri appartenenti alla superfamiglia di recettori accoppiati a proteine G, con 7 α -eliche transmembrana (Berger et al., 1999 Doms et al., 1997), che costituiscono i recettori per le α e β chemochine. Tra questi, due co-recettori giocano un ruolo di rilievo: il recettore per α -chemochina, il CXCR4 (originariamente definito fusina) e il recettore per la β -chemochina, il CCR5; l'identificazione di questi due recettori, spiega il diverso tropismo di alcuni isolati. Infatti, le linee di cellule T, tipicamente, esprimono CXCR4 e non CCR5, i linfociti sia CXCR4 sia CCR5 e i macrofagi CCR5. In base a queste osservazioni, è stato sviluppato un sistema di nomenclatura per gli isolati virali: i virus che utilizzano come co-recettore il CXCR4 (generalmente gli TLC-tropic), sono definiti virus X4, gli isolati che utilizzano CCR5 (gli M-tropic) sono definiti isolati R5 e i virus che utilizzando entrambi i co-recettori (*dual-tropic*), sono detti R5X4.

Il tropismo di HIV è determinato dalla regione V3 di gp120, ma sono implicate anche le regioni V1 e V2. Il legame tra gp120 e CD4 provoca un cambio conformazionale in gp120, in modo da aumentare l'affinità con il co-recettore, formando, così, un complesso ternario costituito da gp120, CD4 e il co-recettore. Esistono alcuni isolati che sono in grado di legare il co-recettore e infettare la cellula, anche in assenza di CD4 (Endres et al., 1996), perché in questi isolati la gp120 è in una conformazione costitutivamente attiva. L'importanza dei co-recettori *in vivo* è evidenziata da numerosi studi che indicano come l'eterogeneità genetica degli alleli dei co-recettori, può influire sulla suscettibilità di un individuo all'infezione da HIV, o può alterare il corso della malattia dopo l'infezione. Un chiaro esempio, è dato da una mutazione definita CCR5/ Δ 32: individui omozigoti per questo allele mutante, risultano quasi totalmente resistenti all'infezione da HIV, mentre gli eterozigoti, sono normalmente suscettibili all'infezione ma con una maggiore tendenza ad un più prolungato decorso del periodo asintomatico (Dean et al., 1996 Samson et al., 1996).

Questa osservazione identifica i co-recettori come target per la terapia antiretrovirale.

Fusione della membrana, retrotrascrizione ed import nucleare

Il cuore della reazione di fusione è l'ectodominio di gp41 (chiamato anche peptide di fusione) e due motivi ripetuti invertiti HR1 e HR2. Infatti, le variazioni del trimero gp120/gp41/co-recettore sono trasmesse alla gp41, portando alla formazione del poro di fusione, ovvero all'inserimento del peptide nella membrana e all'esposizione di due regioni a sequenze ripetute, HR1 e HR2 (FIG. 5).

Queste sequenze si avvolgono a formare una struttura a elica parallela alle due membrane che le avvicina fino ad indurre la loro fusione (Ryser et al., 2005) e il seguente rilascio del core all'interno della cellula.

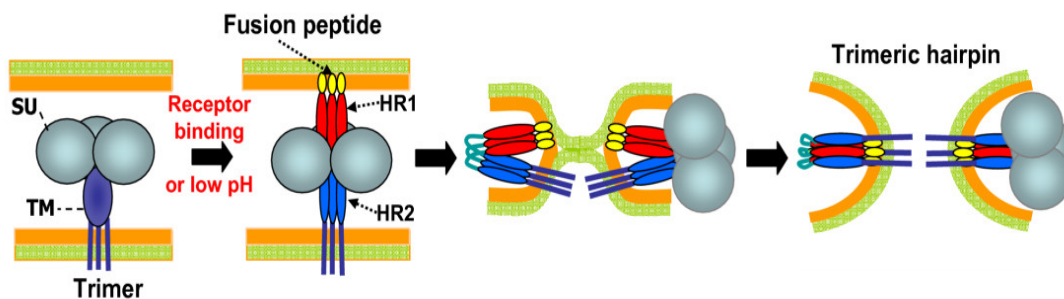


Figura 5: Reazione di fusione delle membrane

Mutazioni a carico del peptide di fusione o dei peptidi derivati, possono agire come inibitori del processo di fusione. All'interno della cellula, il virione si libera delle proteine strutturali (*uncoating*) con la successiva formazione del complesso di retrotrascrizione (RTC) costituito dal genoma virale legato al tRNA primer, l'integrasi, la retrotrascrittasi, la proteina della matrice (MA), la proteina del nucleo capsidico (NC), la proteina accessoria Vpr e alcune proteine cellulari. Il complesso di retrotrascrizione permette la formazione dell'intermedio a DNA necessario per la replicazione. L'enzima coinvolto è la retrotrascrittasi virale che mostra una triplice attività di DNA polimerasi RNA dipendente, DNA polimerasi DNA dipendente e di RNasi di tipo H.

Il primer è una molecola di tRNA legato al PBS (*primer binding site*) e la sintesi del DNA procede dall'estremità 5' generando un ibrido DNA/RNA. Tramite l'attività RNasica di tipo H, il filamento di RNA dell'ibrido viene degradato, generando lo strand negativo. Utilizzando una piccola regione di omologia (detta regione "R"), l'enzima promuove il trasferimento del tratto neoformato e la sintesi completa dell'elica a partire

dall'estremità 3' della porzione appaiata. Analogamente a quello negativo, lo strand positivo viene sintetizzato in due fasi: nella prima si forma il tratto compreso fra il secondo innesco, localizzato in una regione ricca di purine (PPT) da cui non viene completamente rimosso l'RNA, e l'estremità 3' dello stampo, e nella seconda fase si ha l'appaiamento e il completamento del processo. Gran parte della variabilità genetica di HIV è imputabile all'elevato tasso di errore (3×10^5) e la bassa affinità per il substrato da parte della retrotrascrittasi.

Integrazione

Quando il processo di retrotrascrizione è completo, si forma il complesso di pre-integrazione (PIC) che deve superare la membrana per raggiungere il nucleo. Il passaggio è mediato da tre interazioni che, probabilmente, agiscono in modo cooperativo: i due segnali di localizzazione nucleare (NLS) della proteina MA la connettono alle importine α e β , che fanno parte del normale sistema di importazione cellulare, e le NLS non convenzionali di Vpr e dell'integrasi (IN), che mediano il contatto diretto con il poro nucleare senza l'intervento delle importine. All'interno del nucleo l'integrasi catalizza l'inserimento del cDNA in un cromosoma della cellula ospite (Brown et al., 1997). Il DNA integrato, definito provirus, si comporta come un gene cellulare. L'integrazione ha inizio con la rimozione di alcuni nucleotidi dall'estremità 3' dei DNA virali in modo da generare estremità CA-OH libere, analoghe a quelle osservate per i trasposoni. Queste si inseriscono all'interno di un taglio prodotto dall'enzima nel filamento cellulare, legandosi all'estremità 5' rimasta libera. Infine avviene la rimozione dei nucleotidi spaiati al 5' virale, la ligazione di questo tratto, formando un pro virus fiancheggiato da due sequenze ripetute. Le forme integrate possono essere trascrizionalmente attive o passare allo stato di latenza e costituire il *reservoir* virale. Questo è costituito da cellule in cui il virus non si replica e che, sfuggendo sia alle difese immunitarie sia alla terapia, impediscono l'eliminazione completa del patogeno nell'organismo. In alcuni casi, l'infezione da HIV può risultare silente, senza dare origine ad una nuova progenie virale. Questa latenza di HIV può essere dovuta al sito dove avviene l'integrazione del genoma virale nel genoma della cellula ospite; o all'organizzazione della cromatina durante l'integrazione (metilazione, presenza di regioni eterocromatiniche); o ancora a una bassa, o assente, espressione di Tat o di Rev (Siliciano et al., 2000); oppure ad una scarsa stimolazione del promotore

per la mancanza di fattori di trascrizione cellulari e virali (Peterlin et al., 2003). Inoltre esistono numerose proteine cellulari, come l'istone deacetilasi (HDAC) e il fattore antivirale della CD8⁺, che possono portare ad un arresto dell'infezione virale nelle cellule infettate (Romerio et al., 1997 Sheridan et al., 1997).

Trascrizione: funzione di Tat

Le sequenze LTR di HIV servono come sito di inizio della trascrizione e contengono gli elementi *cis*-agenti necessari per la sintesi dell'RNA. Un LTR è costituito da tre regioni: U3 (*unique 3'end*), R (*repete*) e U5 (*unique 5'end*). La trascrizione inizia nella giunzione U3/R; in U3 sono presenti una serie di elementi che dirigono il legame della RNA polimerasi II al DNA templato. Infatti, troviamo una TATA box, cui si lega il fattore di trascrizione IID (TFIID), a circa 25nt dal sito di inizio della trascrizione; al 5' della TATA box ci sono tre siti di legame per Sp1 e due per NFκB, importanti per la replicazione virale. I livelli di trascrizione basale sono molto bassi in HIV, ma la sintesi dell'RNA è notevolmente incrementata in presenza della proteina Tat (Dayton et al., 1986 Fisher et al., 1986). Da numerosi studi è emerso che Tat agisce legandosi su un elemento a RNA, noto come *transactivation response region* (TAR), che è presente nel 5' di tutti gli RNA virali. Tat recluta su TAR il complesso P-TEFb (*positive transcriptional elongation factor b*), di cui fa parte l'eterodimero, costituito dalla ciclina T1 e dalla chinasi ciclina dipendente CDK9, che fosforila il dominio C-terminale della RNA polimerasi II, stimolando la processività della trascrizione (Freed et al., 2001).

Export dell'RNA: funzione di Rev

Gli RNA messaggeri che si generano nel nucleo sono raggruppabili in tre categorie: quelli non sottoposti a splicing, da cui derivano le poliproteine Gag, Gag-Pol e il materiale genetico dei nuovi virioni; quelli parzialmente tagliati, che codificano per le proteine Env, Vif, Vpu e Nef; e i prodotti dello splicing completo, Rev, Tat e Nef. I primi messaggeri a essere trascritti sono quelli originati dallo splicing completo e quindi si ha la formazione della proteina Rev, che si lega a RRE (*Rev responsive element*), localizzato su tutti gli RNA che non sono ancora stati processati e su quelli parzialmente processati. Il legame tra Rev e RRE genera un complesso in grado di interagire con il

macchinario di export nucleare cellulare e permettere l'export di tutti i messaggeri nel citoplasma e la formazione di tutte le proteine virali.

Produzione di particelle virali

Dopo la sintesi di tutte le proteine virali, ha inizio l'assemblaggio delle nuove particelle virali. Un ruolo fondamentale durante questo processo è giocato dalla poliproteina Gag, che contiene i segnali per l'ancoraggio alla membrana, per la polimerizzazione delle proteine, per promuovere l'interazione Gag-Gag, l'incapsidazione del RNA virale, l'associazione con Env e il "budding" finale dalla cellula.

Legame di Gag alla membrana e traeting

L'assemblaggio dei lentivirus ha inizio nella membrana plasmatica delle cellule infette. In questa fase, è implicato il dominio MA di Gag, che subisce una modifica co-traduzionale, all'N terminale, data dall'aggiunta dell'acido miristilato. La miristilazione è essenziale per il legame alla membrana, infatti, le cariche positive dei residui basici esposti sulla superficie di MA interagiscono con le cariche negative dei fosfolipidi della membrana.

Incapsidazione dell'RNA

Il segnale di *packaging* di HIV-1 è dato, inizialmente, da 4 strutture a *stem-loop*, note come SL1, SL2, SL3, SL4. Sebbene le sequenze all'interno di queste strutture contribuiscano al packaging, sono fondamentali le strutture secondarie assunte piuttosto che le sequenze nucleotidiche per conferire specificità all'impaccamento. Gli RNAs che perdono il segnale di packaging, non vengono incapsidati efficientemente nelle particelle virale. Gli RNA retrovirali sono legati insieme ad una sequenza vicino il 5' del genoma, in una regione detta DIS (*dimer initiation signal*). La incapsidazione specifica degli RNA retrovirali è mediata dall'interazione tra il segnale di packaging e il dominio NC di Gag. In quasi tutte le proteine virali, il dominio di NC, contiene uno o due motivi a dita di zinco; nel caso di HIV-1 ci sono due motivi a dita di zinco, che le conferiscono la capacità di mediare legami specifici e aspecifici per l'RNA. I legami specifici sono mediati dai segnali di packaging, in particolare SL3; quelli aspecifici dalla presenza dei residui basici. In alcuni casi, però, l'incapsidazione può non essere

specifica; infatti, HIV-1 può incapsidare RNA genomici sia di HIV-1 sia di HIV-2, mentre HIV-2 non riesce ad incapsidare efficacemente HIV-1 (Kaye et al., 1998).

Assemblaggio

L'interazione Gag-Gag sulla membrana, è un evento chiave, fondamentale nell'assemblaggio di nuove particelle virali. Da numerosi studi è emerso che, i domini di Gag coinvolti nello step di assemblaggio, sono: il dominio di dimerizzazione al C-terminale di CA, lo spaziatore p2 e il dominio N-terminale di NC (Freed et al., 1998). Il dominio di dimerizzazione contiene numerosi residui conservati tra i diversi retrovirus che, se mutati, inficiano la fase di assemblaggio, suggerendone un coinvolgimento nell'interazione Gag-Gag; anche mutazioni in NC causano difetti durante l'assemblaggio e, inoltre, la proteina di fusione CA-NC “assembla” meglio, *in vitro*, della sola CA, dimostrando che anche NC è coinvolto in questo step. Il processo di assemblaggio, *in vitro*, richiede la presenza dell'RNA (Campbell et al., 1995) suggerendo, per cui, che l'interazione tra il dominio NC di Gag permette alle molecole di Gag di allinearsi ed impaccarsi correttamente. Infatti, mutazioni nei residui basici di NC, causano difetti nell'assemblaggio e nel legame al RNA.

Trasporto di Env e incorporazione

La poliproteina Env (gp160) è inserita co-traduzionalmente nel lume del reticolo endoplasmatico rugoso (RER), tramite un peptide segnale all'estremità N-terminale. La gp160 è trasportata sulla superficie cellulare per via secretoria e, durante il trasporto, nel Golgi, è tagliata da proteasi della cellula ospite per generare: la glicoproteina matura SU, la gp120, e la glicoproteina transmembrana, gp41. In seguito al clivaggio, gp41 ancora Env alla membrana e si associa non covalentemente con gp120. Env viene internalizzato nella cellula tramite endocitosi, grazie ad un dominio presente nella coda di gp41, e incorporato nelle particelle virali (Freed et al., 1998). Infatti, si è visto che, mutazioni sia su MA sia nella coda citoplasmatica inibiscono l'incorporazione di Env nelle particelle virali; mutazioni in MA possono essere revertite troncando la coda citoplasmatica e mutazione su Env, da mutazioni puntiformi su MA (Mukarami et al., 2000); inoltre Env mutanti per perdita della coda citoplasmatica e piccole delezioni su Env, sono incorporati in numero limitato di cellule (es. HeLa e MT-4) ma non nei virioni e molto altri tipi cellulari (Mukarami et al., 2000).

Budding

Lo step finale nel processo di assemblaggio di un virus è la “gemmazione” del virus dalla membrana plasmatica della cellula ospite. Inizialmente si riteneva questo step come un evento spontaneo, ma si è visto che numerosi retrovirus (in particolare quelli dotati di un envelope) codificano per specifiche sequenze che promuovono il rilascio delle particelle virali. Queste sequenze sono dette domini *late* o “L”, per sottolineare il loro coinvolgimento nelle fasi tardive del ciclo replicativo. In HIV-1, il dominio L è presente in p6; infatti delezioni in p6 o mutazioni di residui di un motivo conservato di p6, provocano difetti nel rilascio delle particelle virali (Gottlinger et al., 1991 Huang et al., 1995). Sebbene non sia ancora chiaro il meccanismo di azione si ipotizza che il dominio L possa agire tramite il pathway di ubiquitinazione della cellula ospite.

Maturazione

Subito dopo, o durante, il rilascio del virus dalla membrana plasmatica della cellula ospite, la proteasi virale taglia le poliproteine Gag e Gag-Pol, per generare le proteine Gag e Pol. Il processamento di Gag e Gag-Pol dà luogo a una cascata di reazioni di clivaggio. L'elemento maggiormente visibile, nella maturazione di HIV-1, avviene a livello della morfologia del virione che passa da una struttura a guscio di noce, dovuta alla presenza di Gag e Gag-Pol disposte a raggiera, ad una struttura caratterizzata da un core elettron-denso, formatosi dalla polimerizzazione della proteina CA attorno al complesso RNA/proteine dentro il core (FIG. 6)

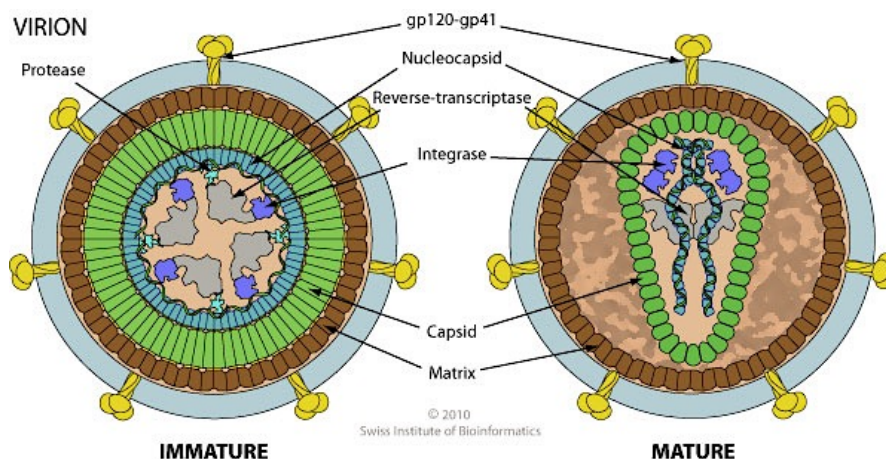


Figura 6: Cambiamento morfologico del virione durante la maturazione

Questa fase è mediata dall'azione della proteasi, che digerisce i costituenti dei virioni, secondo un ordine determinato dalla diversa affinità della proteina per i siti di taglio, e libera le proteine che, riarrangiandosi, costituiscono la struttura definitiva del virione.

Il processo infettivo *in vivo*

Evoluzione clinica

L'infezione da HIV dà luogo ad un processo patologico caratterizzato da un progressivo deterioramento del sistema immunitario che determina un quadro clinico definito sindrome da immunodeficienza umana acquisita (AIDS). La trasmissione del virus avviene tramite il contatto fra un fluido o un compartimento biologico contenente una quantità sufficiente di particelle infettanti con una via d'accesso, costituita di solito da una discontinuità della barriera epiteliale.

L'infezione può dunque avvenire tramite tre modalità:

- per via ematica (scambio di siringhe fra tossicodipendenti, trasfusioni di sangue o derivati e trapianti)
- per via sessuale (rapporti sessuali non protetti)
- da madre a figlio a livello uterino, perinatale o durante l'allattamento

La patogenesi dell'AIDS progredisce attraverso tre fasi, ognuna caratterizzata dal raggiungimento di uno stato di relativo equilibrio tra HIV e il sistema immunitario dell'ospite (FIG. 7).

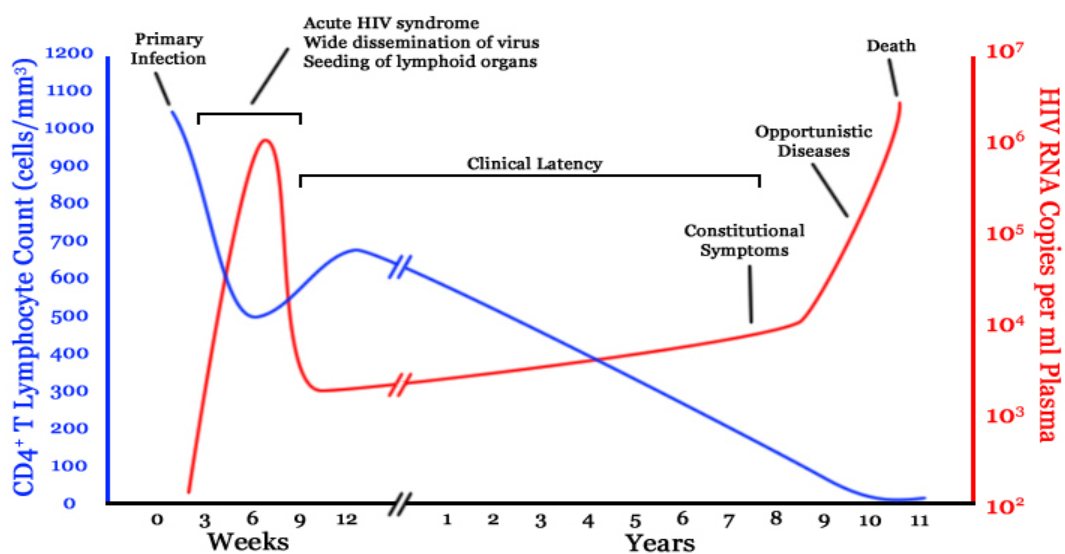


Figura 7: Evoluzione clinica dell'infezione da HIV.

La prima fase, l'**infezione primaria**, comprende il periodo di tempo che va dal momento dell'infezione iniziale fino allo sviluppo di una reazione anticorpale evidenziabile con i test di routine (sierconversione). In questa fase avviene la colonizzazione dei linfonodi e la disseminazione del patogeno nell'organismo; si assiste ad una massiva infezione e lisi dei linfociti T CD4⁺ accompagnata da un'elevata produzione di particelle virali, infatti HIV può essere facilmente isolato dal sangue ed è presente nel siero l'antigene p24 in grande quantità.

Durante questa fase, circa l'80% degli individui infetti, dopo un periodo di 3-6 settimane, mostra clinicamente la cosiddetta "sindrome retrovirale acuta", con un corredo di sintomi che somigliano, in qualche modo, a quelli della mononucleosi infettiva, che si esaurisce spontaneamente in un periodo di tempo variabile da una settimana a tre mesi.

La **fase acuta** rappresenta la risposta iniziale di un individuo immunocompetente all'infezione da HIV. Infatti gli elevati livelli virali nell'organismo, stimolano una risposta immunitaria di difesa virus-specifica, sia umorale che cellulare, che è in grado di limitare il fenomeno, soprattutto grazie all'intervento dei linfociti T citotossici, rilevabili nel sangue quando il quadro virale comincia a diminuire.

Durante l'infezione primaria, la viremia raggiunge spesso valori molto elevati che però declinano abbastanza rapidamente, a dimostrazione che la risposta immune dell'organismo è in grado di stabilire un qualche tipo di controllo sull'infezione, almeno nel breve periodo. La carica virale determinabile in questa fase riflette l'equilibrio raggiunto tra il sistema immunitario dell'ospite e il virus e prende il nome di *set point*; nella maggior parte dei casi rimane stabile per molti anni e il suo valore è indice della velocità di progressione della malattia. Solo l'8% dei pazienti con cariche virali inferiori a 4000 copie/mm³ sviluppa la malattia nei primi cinque anni dal contagio, mentre ciò si verifica per il 62% dei pazienti con valori superiori a 36000 copie /mm³ (Robbins et al., 1999).

Al termine dell'infezione acuta si stabilisce un relativo equilibrio tra la replicazione virale e la risposta immune dell'ospite, con la pressoché totale scomparsa di una viremia apprezzabile ed il soggetto infetto entra nella cosiddetta fase di "**infezione cronica**" o di "**latenza clinica**", durante la quale non presenta segni patologici di rilievo attribuibili all'infezione da HIV. Questa reazione evidenzia *in primis* la risposta antivirale messa in

atto dal sistema immunitario innato e adattativo, dove hanno un ruolo chiave gli anticorpi anti-HIV e le cellule T e natural killer (NK). La latenza è, però, esclusivamente clinica e non virale: la replicazione del virus continua grazie alla massiccia presenza di virus nei vari distretti di tessuto linfoide e soprattutto nel tessuto linfoide associato alla mucosa intestinale o GALT, che sembra rappresentare uno dei principali, se non il principale, *reservoir* dell'infezione. La velocità di progressione dell'infezione verso la malattia, varia considerevolmente nei soggetti adulti (nei bambini infetti, per infezione congenita o perinatale, invece, la progressione verso lo stadio di malattia conclamata è piuttosto rapida) ed è in rapporto alla intensità del calo dei CD4 ed al livello di viremia. Successivamente, compare la sintomatologia associata al passaggio alla fase tardiva; una linfadenopatia persistente (*Lympho-Adenopathic Syndrome LAS*), seguita da perdita di peso, febbre e diarrea (stadio ARC, *AIDS-Related Complex*), spesso associate alla comparsa di infezioni opportunistiche da *Herpes simplex* o da *Candida albicans*. Dopo circa 10 anni di infezione, il 50% dei pazienti mostra i primi segni dell'infezione, tra cui calo delle cellule T CD4⁺ e delle CD8⁺ attive contro HIV; i linfonodi sono sempre più devastati dalla progressione dell'infezione (. Quando il numero dei linfociti scende al di sotto di 350 cellule / μ l (Buchbinder et al., 1994), è ormai avvenuto il passaggio alla fase terminale della malattia, definita **AIDS conclamato**. In questa fase compaiono una serie di infezioni opportunistiche da microrganismi o virus poco patogeni per i soggetti normali o, comunque, in sedi e con una frequenza ed un decorso non osservabili in soggetti normali, nonché una serie di manifestazioni neoplastiche e, infine, la cosiddetta encefalopatia da HIV, con ampie lesioni degenerative del sistema nervoso centrale che, in qualche caso, può iniziare precocemente durante l'infezione ed esprimersi con sintomi psichiatrici di rilievo (*AIDS-related dementia*). Nonostante la disponibilità di farmaci ad azione antivirale e di farmaci antimicrobici teoricamente attivi sugli agenti eziologici delle varie infezioni opportunistiche, lo stadio di AIDS conclamato che si accompagna ad un sistema immune incapace ormai di una qualsiasi risposta efficace, è destinato a concludersi con la morte del paziente. Circa il 5% della popolazione infetta da HIV, riesce a sopravvivere e non mostra sintomi della malattia per molti anni; i soggetti appartenenti a questa popolazione vengono definiti *long-term non progressors*, o semplicemente LTSs. Alcuni sono infetti da più di 10 anni, altri da più di 30 anni, e rimangono sani e con livelli di cellule CD4⁺ normali, senza ricevere terapia antiretrovirale. I LTSs hanno diverse caratteristiche che ne influenzano positivamente la sopravvivenza, come, ad esempio, mutazioni nel virus infettante (perdita di Nef),

polimorfismi genetici nella risposta immune dell'ospite (es. HLA), notevoli risposte immunitarie cellulari anti-HIV (cellule NK, CD8⁺), mancanza di un allele di CCR5, anticorpi neutralizzanti o mancanza di anticorpi promotori.

Patogenesi dell'immunosoppressione

Per quanto riguarda la patogenesi dell'AIDS, esistono ancora numerosi aspetti che attendono un chiarimento completo. Non c'è dubbio, però, che i cardini su cui poggia la patogenesi della sindrome da immunodeficienza acquisita siano rappresentati da una precoce, prolungata, eccessiva, iper-stimolazione della risposta immune umorale e cellulo-mediata, con una graduale disorganizzazione del network di segnali di regolazione e, soprattutto, da una progressiva, inesorabile, diminuzione dei linfociti T CD4⁺, che portano ad un collasso della capacità di risposta immune dell'organismo.

Come già detto, nella fase iniziale il soggetto infetto mostra una specifica risposta immune umorale (produzione di anticorpi) e cellulo-mediata (grazie ai linfociti T CD8 citotossici); in entrambi i casi, è coinvolta la produzione di una serie di citochine, da parte di specifici linfociti T helper CD4, attivati dal contatto con i relativi antigeni presentati dalle molecole di MHC-II. Gli specifici linfociti T citotossici CD8, soprattutto, sono in grado di impedire la replicazione virale sia direttamente, riconoscendo e uccidendo le cellule infette che presentano gli epitopi di proteine di HIV nelle molecole di MHC-I, sia indirettamente, producendo chemochine solubili con azione antivirale, quali RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β che, attraverso il blocco dei recettori, impediscono ad HIV di infettare altre cellule. La risposta immune umorale sembra meno efficace nel controllo della viremia, e la presenza di anticorpi efficacemente neutralizzanti è relativamente scarsa, anche per la capacità di mutare, del virus, in specifici domini del genoma. Anche se viene innescata la risposta immune da parte dell'organismo, HIV continua a replicarsi attivamente in una serie di organi linfoidi, con la produzione di una notevole quantità di particelle virali, molte delle quali presentano continue e nuove modificazioni antigeniche che sfuggono alla risposta immune innescata inizialmente e provocano il continuo reclutamento nella attivazione immune di nuovi cloni di T CD4 e di T CD8. La deplezione dei linfociti T CD4 è uno degli elementi fondamentali, il principale forse, della patogenesi dell'AIDS, in grado di misurare il rischio della comparsa di infezioni opportunistiche e delle altre complicanze

patologiche che contraddistinguono gli stadi più avanzati della patologia. Questa deplezione è data sia da un'aumentata distruzione periferica dei T CD4, sia da una diminuita produzione di nuovi linfociti T CD4.

HIV integra il suo genoma all'interno di quello della cellula ospite, avviando il ciclo di replicazione virale produttiva, esclusivamente nei T CD4 attivati; da ciò risulta che proprio la popolazione dei linfociti T CD4 HIV-specifici, è quella più esposta all'azione letale prodotta dall'infezione virale (con una selettiva deplezione, quindi, proprio della popolazione linfocitaria T CD4 virus-specifica), che si realizza attraverso l'induzione della fusione cellulare in sincizi. Non solo, ma poiché una quota dei linfociti T CD4 attivati e infetti si ri-differenziano in cellule di memoria non più attivate, essi finiscono per formare un essenziale *reservoir* di cellule portatrici del genoma provirale integrato (infezione latente) dove il virus può persistere per tutto il periodo di vita delle cellule, la cui emivita è di molti anni, al riparo degli effettori della risposta immune e in forma inattaccabile dai farmaci antivirale che agiscono solo in alcune fasi del ciclo di replicazione, che si verificano solo in caso di infezione produttiva.

Tuttavia, il calo dei linfociti T non è ascrivibile alla sola infezione diretta, bisogna considerare, infatti, anche gli effetti del virus sulla popolazione linfocitaria sana: si tratta di fenomeni apoptotici innescati sia da proteine di origine virale che da alterazioni dell'ambiente extracellulare (Alimonti et al., 2003). Infatti, anche i linfociti T CD4 non infetti, vanno incontro a morte per apoptosi, in seguito al legame di gp120 con il corecettore, soprattutto, CXCR4, distruggendo una sempre crescente popolazione che va al di là della sola porzione di cellule direttamente infettate dal virus. Alla massiccia distruzione periferica dei linfociti T CD4, si associa anche una diminuita produzione di linfociti per il probabile danneggiamento indiretto dei progenitori della filiera di cellule linfoidi. L'aumento del turnover linfocitario T conseguente a questa situazione determina l'esaurimento del pool di cellule naïve e di cellule della memoria allo stato quiescente e quindi una minore efficienza nella risposta ai patogeni (Silvestri et al., 2003). Dal momento che HIV causa l'apoptosi delle cellule progenitrici CD34⁺, si ha la riduzione degli elementi precursori, non solo linfocitari, ma anche piastrinici ed eritrocitari (Dion et al., 2004). Inoltre, l'avanzare della malattia porta alla distruzione dell'architettura delle due principali sedi di produzione e maturazione dei linfociti: i linfonodi e il timo. Infatti, sia le cellule follicolari dendritiche che quelle timiche, sono suscettibili all'infezione e, pur manifestando una maggiore resistenza agli effetti

citopatici, perdono comunque la loro funzionalità e con il tempo vanno incontro a morte. Nel considerare l'immunopatogenesi della malattia da HIV non si devono omettere le interazioni del patogeno con altri tipi cellulari, quali i monociti e i macrofagi. Dal punto di vista funzionale, la presenza del virus in queste cellule può portare ad anomalie nella presentazione dell'antigene e nella secrezione di citochine che inficiano la risposta immune sia umorale sia cellulare. I macrofagi, tuttavia, sono resistenti agli effetti citopatici diretti dell'infezione e vanno a costituire un *reservoir* virale. Data la capacità di monociti e macrofagi di migrare e sopravvivere in diversi tessuti dell'organismo, possono essere considerati potenziali vettori d'infezione, nonché i responsabili della cronicità e dei danni tissutali della stessa. Infatti, nella maggior parte dei tessuti di pazienti affetti da AIDS, la quantità di virus associata ai macrofagi supera ampiamente quella associata ai linfociti (Verani et al., 2005).

Diagnosi

Siccome l'infezione da HIV è seguita dalla costante e progressiva replicazione del virus in una serie di organi bersaglio, la sierconversione, ossia la mera rivelazione della presenza di anticorpi specifici per HIV nel siero di un individuo, consente di porre inequivocabilmente la condizione di infezione in atto (anche se clinicamente silente).

La **ricerca di anticorpi** si esegue mediante reazioni immunoenzimatiche (con eventuale conferma tramite immunoblotting) nei confronti di miscele di antigeni ricombinanti e/o di peptidi sintetici che riproducono gli epitopi antigenici più significativi delle principali proteine strutturali del virus. Sebbene la presenza di anticorpi rappresenti una sicura diagnosi di infezione, ha precisi limiti di utilizzo in almeno tre circostanze:

- nella fase iniziale (3-4 settimane) dell'infezione, poiché la quantità di anticorpi circolanti non è ancora sufficiente ad essere evidenziata dalle tecniche di rilevazione disponibili (la cosiddetta "finestra" iniziale);
- nei neonati da madre infetta da HIV, che possiedono gli anticorpi sierici anti-HIV di origine materna;
- nella, seppur modesta, percentuale di soggetti infetti i cui i risultati delle indagini sierologiche possono dare risultati di dubbia positività (i cosiddetti risultati *borderline*)

Per accertare la presenza di infezione è necessario ricorrere alla **ricerca del virus**. Si può isolare HIV allestendo co-culture di cellule mononucleate di sangue periferico del soggetto in esame con cellule mononucleate di sangue periferico di donatori sani, in presenza di idonei fattori che stimolano l'attivazione cellulare e, monitorando periodicamente la comparsa di antigeni virus-specifici (molto utilizzato, in genere, il dosaggio della p24) nel surnatante delle colture. Si tratta però di una tecnica relativamente indaginosa che richiede tempi abbastanza lunghi e laboratori particolarmente attrezzati. Di norma, quindi, la ricerca della presenza del virus (nel sangue periferico) viene eseguita mediante la rivelazione di antigeni specifici (ricerca della proteina p24 del core virale che viene attualmente associata alla ricerca anticorpale negli ELISA di ultima generazione) e/o la ricerca di specifiche sequenze nucleotidiche (DNA provirale, RNA virionico). Il tipo di indagine di maggiore affidamento resta la ricerca del virus mediante rilevazione, con idonee metodiche di amplificazione (PCR), della presenza di DNA provirale nei linfomonociti circolanti; infatti la sua positività è costante in tutti i soggetti infetti, indipendentemente dalla presenza di replicazione virale.

Per monitorare l'efficacia della terapia antivirale, si esegue il *follow-up* del paziente, cioè si stabilisce il livello di replicazione virale misurando la quantità del virus (il cosiddetto carico virale o *viral load*) presente in circolo. Per avere indicazioni utili sul *viral* e sul *pro-viral load* si ricorre a:

- determinazione quantitativa del DNA provirale mediante PCR,
- determinazione quantitativa di HIV-1 RNA nel plasma.

Il *viral load* è espresso come numero di molecole di HIV-1 RNA/ml nel plasma e rappresenta, ormai, il criterio fondamentale sia per impostare una terapia antivirale sia per valutare l'efficacia del regime terapeutico in atto e la prognosi della malattia.

Epidemiologia

Dal 1982, anno della notifica dei primi casi, più di 50 milioni di persone hanno contratto il virus dell'HIV. La diffusione della malattia è stata inizialmente molto

rapida, con un raddoppio dei casi ogni 5 mesi fino al 1985, per poi assestarsi su valori d'incidenza minori ma non sufficienti a bloccare l'espansione della pandemia.

Fin dalle prime osservazioni sulle modalità di infezione furono identificate alcune categorie a rischio, costituite da omosessuali, tossicodipendenti, politrasfusi ed emofilici, eterosessuali che avessero avuto rapporti non protetti e figli di donne sieropositive. Si riscontra inoltre una correlazione sempre maggiore tra la prevalenza della patologia e alcuni fattori socio-economici (povertà, differenze di genere, emarginazione di alcuni strati della popolazione) che ostacolano la diffusione dei trattamenti profilattici e terapeutici. In mancanza di un vaccino e di farmaci in grado di eradicare l'infezione, il controllo più efficace dell'epidemia può essere realizzato solo attraverso la prevenzione. Questa è legata soprattutto alla diffusione della conoscenza riguardo alle modalità di contagio, soprattutto fra le popolazioni a rischio.

Fattori che influenzano il ciclo dell'infezione da HIV

Immunodeficienza

La distruzione delle cellule T CD4⁺ è la prima causa dell'insorgenza di infezioni opportunistiche associate all'infezione da HIV. I fattori che determinano questa perdita in funzione e numero di linfociti sono molteplici:

- Effetto citopatico diretto dell'HIV e delle proteine virali sulle cellule CD4⁺ e sui loro progenitori;
- Effetti di HIV sulla permeabilità della membrana cellulare, con incremento della fragilità delle CD4⁺;
- Induzione dell'apoptosi via attivazione citochimica e da interazione gp120/CD4;
- Distruzione del midollo osseo (pancitopenia);
- Citotossicità delle citochine: ad esempio TNF- α (Amesein et al., 1994) e proteine dell'HIV (Tat, Nef, Vpr, Vpu) possono influenzare positivamente la portata della replicazione dell'HIV, quindi la morte delle cellule CD4⁺;
- Deterioramento funzionale e strutturale del tessuto linfoide (es., timo) e successiva riduzione della produzione di nuove cellule;
- Citotossicità delle cellule anti-CD4⁺ (cellule CD8⁺ e CD4⁺, cellule NK) contro cellule CD4⁺ normali;
- Autoanticorpi cellulari anti-CD4⁺

Risposta immunitaria anti-HIV dell'ospite

La risposta immunitaria dell'ospite, che consiste in componenti cellulari e umorali dell'immunità adattativa e innata, influenza fortemente l'andamento del decorso clinico della malattia. La velocità nella risposta immunitaria verso agenti patogeni esterni può essere determinante: il sistema immunitario adattativo può impiegare anche giorni per rispondere all'infezione, mentre il sistema immunitario innato è in grado di reagire nel giro di minuti o di poche ore. L'immunità innata, infatti, non risponde a specifici epitopi, bensì in modo più generico verso pattern conformazionali dei patogeni (Akira et al., 2006).

Resistenza del virus alla risposta immune

HIV ha a disposizione diversi meccanismi con cui resistere all'azione anti-HIV. Tra questi sono incluse la mutazione delle proteine virali, mancata esposizione dei peptidi virali nelle cellule infette da HIV, o scorretta espressione di questi sulle APCs (Antigen Presenting Cells).

Terapia antiretrovirale

La storia della terapia antiretrovirale, rivolta ai pazienti affetti da HIV, inizia nel 1987, con l'approvazione da parte della Food and Drug Administration (FDA) del primo farmaco a dimostrata efficacia terapeutica: l'azidovudina (AZT). Negli anni successivi sono stati approvati e introdotti altri agenti antiretrovirali, capaci di bloccare il ciclo replicativo di HIV. I primi approcci terapeutici utilizzati comprendevano uno o due farmaci e spesso erano destinati al fallimento, ma, a partire dal 1995, con l'introduzione dell'HAART, che consiste nell'associazione terapeutica di almeno tre agenti antiretrovirali, il trattamento dell'infezione da HIV ha subito una svolta radicale, con un forte incremento nella sopravvivenza dei soggetti trattati. A più di vent'anni dall'introduzione della terapia antiretrovirale, non è stato ancora ottimizzato il momento di inizio del trattamento. Generalmente l'inizio della terapia viene stabilito tenendo conto delle caratteristiche individuali di ciascun paziente, come l'impegno ad iniziare e seguire fedelmente il trattamento (compliance), il valore dei CD4 ed i livelli plasmatici di HIV-RNA. Comunque, le ultime linee guida (Linee guida IAS riviste nel 2011)

raccomandano l'inizio della terapia in tutti quei pazienti che presentano un'infezione da HIV sintomatica e nei pazienti asintomatici con valori di carica virale superiore alle 100.000 copie/ml e conta dei CD4 inferiore alle 500 cellule / μ l. Dovendo essere somministrato per lungo tempo, il regime terapeutico deve essere basato su principi razionali di sequenzialità dei farmaci, di durata dell'effetto antivirale, di conservazione di opzioni future. Su queste basi è possibile impostare una personalizzazione della terapia che permetta di ottenere il massimo successo virologico e immunologico riducendo al minimo gli eventi avversi e la comparsa di mutanti resistenti alla terapia.

Principali farmaci antivirali

Le conoscenze sempre più approfondite sulla biologia del virus hanno aperto la strada a formulazioni farmacologiche la cui somministrazione, in regime HAART, è in grado oggi di limitare la progressione verso la fase di AIDS conclamata e di cronicizzare la malattia, aumentando notevolmente l'aspettativa di vita dei pazienti.

I farmaci oggi disponibili per la terapia dell'infezione da HIV-1 appartengono a quattro classi distinte che mirano principalmente a colpire o enzimi chiave del ciclo cellulare del virus (proteasi, la retrotrascrittasi e l'integrasi) o fasi virali più a monte, come la fase di ingresso del virione nella cellula ospite (FIG. 8).

Di conseguenza, possono essere raggruppati in quattro classi principali:

- inibitori (nucleosidici e non nucleosidici) della trascrittasi inversa
- inibitori specifici della proteasi virale
- inibitori del processo di *entry* virale
- inibitori dell'integrasi

La prima classe comprende diversi composti che condividono la stessa funzione ma differiscono per la struttura chimica, e quindi anche per il meccanismo d'azione. All'interno di questa categoria possiamo distinguere gli inibitori nucleosidici (NRTI) e gli inibitori non nucleosidici (NNRTI).

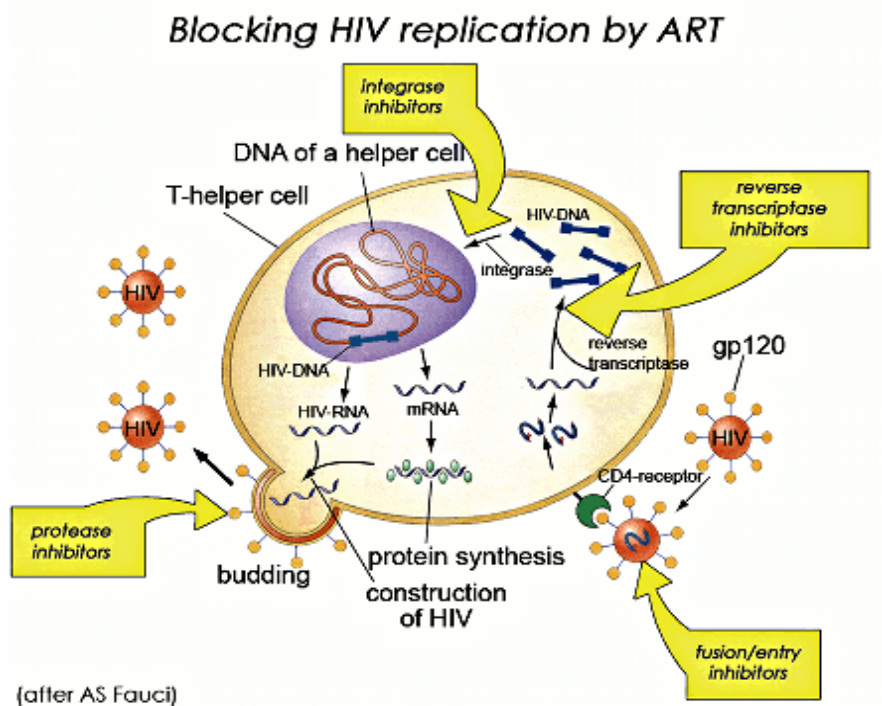


Figura 8: fasi del ciclo replicativo virale target dei farmaci antiretrovirali

Gli **inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI)** sono nucleosidi strutturalmente modificati che agiscono nelle fasi precoci della replicazione, per prevenire l'infezione delle cellule sane; inibiscono competitivamente l'enzima RT perché, essendo incorporati nel filamento di DNA nascente, ne causano la terminazione precoce (terminatori di catena) o ne alterano la funzione. Ciascuna di queste molecole deve essere attivata intracellularmente, tramite la fosforilazione da parte di chinasi citoplasmatiche, per la realizzazione delle forme trifosfato che competono con il deossinucleotide naturale per il legame alla RT.

La Zidovudina (3'-azido-2',3'-dideossitimidina; AZT) è un analogo del nucleoside timidina. La forma trifosfato del farmaco è un inibitore competitivo con affinità per la trascrittasi inversa 100 volte superiore rispetto al substrato naturale dell'enzima, la deossitimidina trifosfato (dTTP). L'azione del farmaco è dovuta alla sostituzione del gruppo ossidrilico in posizione 3' del ribosio con un gruppo azide. Ciò impedisce la formazione del legame 3'-5' fosfodiesterico con il nucleoside successivo, provocando l'arresto della trascrizione della catena di DNA nascente (Furman et al., 1986). Inizialmente il farmaco era somministrato in monoterapia a dosi elevate (1500 mg/die) con frequenti effetti collaterali, in particolare mostrava un'elevata tossicità midollare

(Fischl et al., 1987). In seguito, è stato osservato come il farmaco *in vitro* avesse effetti antiretrovirali sinergici con altri NRTIs e numerosi PIs (Merrill et al., 1996) e la disponibilità sul mercato di questi nuovi composti ha permesso di ridurre le dosi a 500 mg/die, comportando un abbassamento dei livelli tossici (Collier et al., 1996).

Altri farmaci appartenenti alla classe degli NRTIs sono: la Didanosina (2',3'-dideossinosina; ddI), analogo nucleosidico dell'adenosina, fosforilato nelle cellule bersaglio in dideossiadenosina trifosfato; la Lamivudina ((-)-b-enantiomero della 2',3'-dideossi-3'-tiocitidina; 3TC) e l'Emtricitabina ([-]-2',3'-dideossi-5-fluoro-3'-tiocitidina; FTC), analoghi della citosina; la Stavudina (2',3'-dideidro-2',3'-dideossitimidina; d4T), analogo della timidina.

La Didanosina e la Stavudina differiscono dai loro analoghi per la presenza di un idrogeno al posto di un gruppo ossidrilico, mentre la Lamivudina, l'Emtricitabina e l'Abacavir presentano modifiche strutturali più complesse, che però non compromettono la loro affinità per la trascrittasi inversa virale.

L'Abacavir (ABC), analogo della guanosina, necessita, prima di essere somministrato, lo screening dei pazienti per la presenza di un gene specifico denominato "HLA-B (tipo 5701)": se tale gene è presente sussiste un maggior rischio di reazione di ipersensibilità (reazione allergica), per cui, in questi soggetti, è possibile prescrivere Abacavir solo in casi eccezionali (mancanza di altre terapie alternative). Le reazioni di ipersensibilità sono caratterizzate quasi sempre da sintomi quali febbre e/o eruzioni cutanee, ma anche spesso da nausea, vomito, diarrea, dolori addominali, dispnea (difficoltà di respirazione), tosse, letargia, malessere generale, mal di testa, segni di danni a carico del fegato nel sangue e mialgia (dolore muscolare). A questa classe appartiene anche il Tenofovir (9-[-(R)-2-(fosfonometossi)propil] adenina; TDF), un analogo nucleotidico dell'adenina, con un meccanismo d'azione identico agli altri farmaci di questa categoria, con l'unica differenza che la sua attivazione intracellulare non necessita di fosforilazione.

Gli **inibitori non nucleosidi della trascrittasi inversa (NNRTI)** inibiscono, come gli altri NRTI, la trascrittasi inversa, ma si legano direttamente all'enzima trascrittasi inversa, in siti diversi da quelli in cui si legano gli analoghi nucleosidici. Infatti, gli NNRTI bloccano la tasca idrofobica all'interno della subunità p66 della RT che, in tal modo, è in grado di incorporare un minor numero di nucleosidi ed il processo di polimerizzazione viene significativamente rallentato. Appartengono a questa classe:

Nevirapina (NVP), Efavirenz ed Etravirina. Hanno il vantaggio di essere privi di effetti collaterali sulle cellule ematopoietiche e di non mostrare resistenza crociata con gli altri nucleosidici della RT, ma favoriscono subito la selezione di mutanti resistenti. Efavirenz è anche associato a effetti sul sistema nervoso centrale (SNC) che, nella maggioranza dei pazienti, scompaiono entro le prime settimane di trattamento. L'impiego di questi farmaci deve avvenire sempre in sinergia con i NRTI e i PI e si associa a effetti antivirali imponenti (Deecks et al., 2003).

Gli **inibitori della proteasi** (PI) agiscono in uno stadio tardivo del ciclo virale per scindere i precursori proteici in proteine virali mature. Poiché l'azione enzimatica della proteasi si sviluppa attraverso la processazione della poliproteina Gag-Pol e che solo le forme così processate 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. A oggi, la FDA (*Food and Drug Administration*) americana ha approvato 10 inibitori della proteasi per il trattamento dell'infezione da HIV; l'avvento di questi farmaci ha permesso una migliore gestione dell'infezione e ha consentito lo sviluppo di combinazioni terapeutiche più efficaci. Infatti, l'aggiunta di un PI a due farmaci con differente meccanismo d'azione (ad esempio 2 NRTI o 1NRTI e 1 NNRTI), ha condotto allo sviluppo della HAART. A questa classe appartengono il Saquinavir, l'Indinavir, il Ritonavir, il Nelfinavir, l'Amprenavir, il Fosamprenavir, il Lopinavir, l'Atazanavir, il Tripanavir e il Darunavir. Spesso questi farmaci sono "boosterizzati" farmacocineticamente con Ritonavir, ciò fa sì che la potenza del composto impiegato sia superiore a quella di un PI tradizionale. Grazie ai differenti enzimi bersaglio coinvolti, non esiste resistenza crociata con gli inibitori delle altre classi, per cui è giustificato un uso razionale di entrambi al fine di contrastare la moltiplicazione del virus.

Inoltre, la resistenza a questa classe di farmaci si manifesta di solito in modo lento e graduale, in quanto richiede l'accumulo di diverse mutazioni; questo fenomeno è stato definito come *barriera genetica*.

Gli inibitori della proteasi sono principalmente metabolizzati dal complesso enzimatico del citocromo P-450. Possono quindi interferire con il metabolismo epatico di numerosi altri farmaci, agendo come induttori o inibitori del citocromo P-450 (Piscitelli et al., 1996 Flexner et al., 1998, Piscitelli 2000).

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

Un altro problema fondamentale, comune anche alle altre classi, è rappresentato dalla scarsa capacità dei PI di attraversare la barriera emato-encefalica, al fine di raggiungere *reservoirs* encefalici di HIV, a causa dell'elevato livello di legame di questi composti con le proteine plasmatiche.

Un'altra categoria di farmaci utilizzati per l'infezione da HIV riguarda gli **inibitori dell'entry virale**. Questi inibitori vanno ad interferire sia con il legame tra antirecettore (gp120 virale) e il corecettore CCR5, sia con il processo di fusione delle membrane. Al primo gruppo appartiene Maraviroc, unico *CCR5 antagonist* licenziato, che agisce nella fase extracellulare del virus direttamente sulla cellula ospite. Il meccanismo di azione differisce in modo radicale da quello degli altri farmaci antiretrovirali: per la prima volta infatti un farmaco è finalizzato ad inibire non tanto una proteina virale, ma un recettore cellulare. L'ingresso di HIV nelle cellule richiede l'interazione sequenziale della glicoproteina virale dell'envelope esterno gp120, con il recettore CD4 ed un corecettore per le chemochine posto sulla superficie cellulare. I principali co-recettori utilizzati da HIV sono il CCR5 ed il CXCR4, recettori chemochinici a sette domini transmembrana. Il corecettore, bloccato dall'antagonista corecettoriale, non può stabilire un legame con la subunità gp120 del virus, impedendo il cambio conformazionale della gp41 e l'ingresso del virus nella cellula. Di conseguenza, il virione non riesce a infettare la cellula T CD4+ e replicarsi.

Alla formulazione dell'antagonista del CCR5 si è giunti grazie all'osservazione e all'analisi di una delezione di 32 paia di basi nel gene CCR5, che conferisce una minore

o assente suscettibilità, da parte degli individui portatori, all'infezione da HIV-1. Gli individui con due alleli wild-type del gene CCR5 (omozigoti WT/WT), predominanti nella popolazione generale, sono più suscettibili all'infezione da HIV-1 rispetto agli eterozigoti WT/Δ32 che ereditano un allele deleto e uno che codifica per il prodotto di trascrizione normale. Inoltre, negli individui eterozigoti la progressione della malattia è significativamente più rapida rispetto a quella osservata negli individui portatori di due copie normali del gene CCR5. Gli omozigoti per la mutazione Δ32 (Δ 32/ Δ 32), non avendo corecettori CCR5 funzionali, appaiono essere resistenti all'infezione da HIV-1. Da queste osservazioni, risulta quindi chiaro che solo i pazienti infetti da virus R5 tropico possono essere i beneficiari del trattamento con questo farmaco.

Un altro farmaco che interferisce con l'*entry* virale è l'Enfuvirtide (T-20).

Enfuvirtide è un peptide sintetico di 36 amminoacidi che blocca l'*ingresso* del virus nella cellula *target*, impedendo la modificazione di gp41-*env* nella sua conformazione fusogena.

Infatti, in seguito al legame tra la glicoproteina di membrana del virus e il recettore CD4, si verifica un cambiamento conformazionale della gp120 che permette un'interazione più stretta tra la gp120 stessa e i corecettori (CCR5 e CXCR4), situati sulla superficie della cellula CD4+. Questa interazione produce un cambiamento conformazionale della gp41 che porta alla formazione di 6 eliche proteiche composte dalle regioni HR1 e HR2. Queste ultime formano una struttura a forcina che porta alla formazione di un poro di fusione attraverso cui il materiale genetico virale entra nella cellula.

Enfuvirtide si lega a gp41 in corrispondenza del dominio HR1 (dominio altamente conservato della gp41), prevenendo il legame con la regione distale di HR-2 e i successivi riarrangiamenti strutturali, e impedendo di fatto la penetrazione del capside virale nella cellula. Il farmaco è stato proposto come possibile opzione terapeutica in quei pazienti in fallimento terapeutico a causa di mutazioni multiple che conferiscono resistenza al tradizionale backbone antivirale. L'osservazione che il meccanismo inibitorio di Enfuvirtide è indipendente dal tropismo virale di CCR5 o CXCR4 rende questo farmaco potenzialmente più potente di composti finalizzati a inibire selettivamente il *binding* di ceppi R5- o X4-tropici ai rispettivi co-recettori.

L'ultima classe dei farmaci antiretrovirali riguarda gli **inibitori dell'integrasi**, di cui fanno parte Raltegravir ed Elvitegravir. Questi antivirali inibiscono l'attività di *strand transfer* dell'enzima integrasi di HIV-1, prevenendo l'integrazione del genoma del virus

nel genoma della cellula ospite. I genomi di HIV-1 che non riescono a integrarsi non possono indurre la produzione di particelle virali infettanti, per cui inibendo l'integrazione si previene non solo la propagazione dell'infezione, ma anche la formazione e la persistenza di *reservoirs* cellulari. Raltegravir ed Elvitegravir mostrano un'alta efficacia terapeutica poiché abbassano rapidamente la carica virale e alzano velocemente il numero dei linfociti CD4, ma possiedono una bassa barriera genetica e, in regimi HAART non completamente attivi, selezionano rapidamente varianti resistenti. Un altro farmaco appartenente a questa classe, di nuovissima concezione, è il Dolutegravir che, al contrario dei primi due, presenta una barriera genetica più alta, una maggiore efficacia di azione e minori effetti collaterali (soprattutto per quanto riguarda il compartimento osseo).

HAART

Con l'introduzione della terapia HAART (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*) e grazie agli studi scientifici ad essa correlati dal 1996, la patologia dell'HIV è diventata gestibile. Il trattamento è composto da più farmaci antiretrovirali, che permettono di ridurre la carica virale e migliorare la situazione immunitaria, e si basa sulla conta del numero dei CD4+. Prima di decidere di iniziare la HAART occorre effettuare un bilancio tra i vantaggi del trattamento sulla morbilità e sulla mortalità e i suoi rischi, considerando anche la tossicità, l'insorgenza di resistenze, l'interazione con altri farmaci, e i costi e i disagi di un trattamento a lungo termine. La continua soppressione virale, sostenuta dall'assunzione dei farmaci della terapia, ripristina e preserva la funzionalità immunologica, diminuendo le infezioni opportunistiche e anche la mortalità. Contano molto anche la disponibilità e la volontà, da parte del paziente, di aderire ad una continua terapia. L'analisi su una coorte di 17517 soggetti asintomatici infetti da HIV-1, che iniziano HAART con una conta cellulare di CD4+ maggiore di 500/ μ l o tra 351 e 500/ μ l la mortalità diminuisce, rispettivamente, del 94% e del 69% (Kitahata et al., 2009). Un'altra analisi su 62760 soggetti con medesime condizioni iniziali di conte cellulari prima dell'inizio del trattamento (500/ μ l o tra 351 e 500/ μ l), la mortalità era ridotta del 23% e del 25%, rispettivamente (Gill et al., 2010). La presenza di indicatori di una rapida progressione della malattia, di un declino repentino nella conta cellulare delle CD4+, la presenza di RNA di HIV-1 rappresentano i motivi per iniziare il trattamento (Hammer et al., 2008). La terapia antiretrovirale riduce

consistentemente la carica virale durante l'infezione primaria e potrebbe ridurre la trasmissione (Rieder et al., 2010 Attia et al., 2009). La terapia iniziale deve essere individualizzata valutando diversi aspetti: i risultati dei test di resistenze, l'efficacia virologica prevista, la tossicità, la tollerabilità, la co-morbidità, e, in assenza di particolari esigenze, anche i costi e l'accessibilità economica devono essere tenuti in considerazione. I dati attuali suggeriscono di utilizzare due NRTI in combinazione con un terzo farmaco di un'altra categoria di inibitori. Una formulazione di terapia che prevede una dose fissa e un'assunzione di una volta al giorno è preferibile per iniziare la HAART.

Insorgenza di resistenze

Negli ultimi anni sono stati fatti molti passi avanti nello sviluppo e l'utilizzo clinico di farmaci per il trattamento dell'infezione da HIV-1. Tuttavia, durante l'evoluzione dell'infezione, insorgono nuove varianti virali, resistenti ad alcuni farmaci della HAART, tramite l'accumulo di mutazioni. Tale aspetto è uno dei principali fattori limitanti nella cura dell'infezione da HIV-1, essendo la principale causa del fallimento terapeutico con progressione della malattia e morte del paziente. L'obiettivo del test di resistenza è di identificare le varianti virali resistenti, per studiare una combinazione di farmaci adeguata. Il test genotipico di resistenza, il più utilizzato, si basa sul sequenziamento delle regioni RT e Proteasi (tramite il metodo di Sanger), soprattutto nelle prime fasi dell'infezione ma può essere anche a carico di altre regioni, come quelle dell'Integrasi e del loop V3, nelle fasi più avanzate della malattia, quando l'insorgenza di resistenza a una o più classi di farmaci antiretrovirali, rende necessario l'utilizzo di farmaci appartenenti a diverse classi. Una volta ottenuta la sequenza del gene virale target del farmaco, tramite opportuni algoritmi matematici, si calcola la resistenza ai principali farmaci: NNRTI, NRTI, inibitori della proteasi, inibitori dell'integrasi e inibitori del processo di *entry* virale. La trasmissibilità della resistenza (TDR) è un fenomeno molto documentato, e molti studi hanno permesso di associarla ad un rischio maggiore di fallimento terapeutico (Saags et al., 2004 Kuritzkes et al., 2008) e di sviluppo di ulteriori resistenze, anche ai farmaci che risultavano efficaci nel regime di trattamento iniziale (Paredes et al., 2010), implicando una più veloce progressione alle fasi avanzate della malattia (Pillay et al., 2006).

Strategie preventive innovative: microbici

Poiché lo sviluppo di vaccini preventivi per l'infezione da HIV-1 procede alquanto lentamente e pazienti sotto HAART possono mostrare un fallimento terapeutico, sono necessarie altre strategie, a breve termine, per sperare di controllare in qualche modo l'epidemia da HIV/AIDS soprattutto nei paesi più poveri ed in via di sviluppo. Per questi motivi si sta cercando di sviluppare e valutare il possibile impiego di agenti microbici (cioè in grado di uccidere agenti esterni, quali i virus) a uso topico, da applicare a livello della mucosa genitale e rettale (sottoforma di gel, creme, etc.) per prevenire la trasmissione sessuale dell'infezione. Per sviluppare un'efficace strategia preventiva, è necessario conoscere la biologia della trasmissione di HIV-1. La maggior parte delle conoscenze deriva dall'analisi dell'epidemiologia di HIV, dallo studio di espianti di tessuto umano, da alcuni studi *in vivo* umani e da studi sulle scimmie e sul loro virus corrispondente, il SIV (*simian immunodeficiency virus*) o il virus chimera SHIV, che è costituito dal virus SIV con l'envelope di HIV. Da questi studi è emerso che dopo meno di un'ora dall'esposizione vaginale, SIV penetra nella mucosa, dove sono presenti le cellule di Langerhans, che si presumono essere i principali bersagli dell'infezione (Hu et al., 2000). La secrezione vaginale probabilmente promuove l'accesso virale alla sottomucosa e ad altri tipi cellulari, come le cellule T, le cellule dendritiche e altre cellule di Langerhans, aumentando così la possibilità di infezione. Il virus attraversa lo strato mucoso e può raggiungere direttamente le proiezioni dendritiche delle cellule che si estendono nella superficie luminale. Infatti, successivamente, si possono trovare piccoli focolai di infezione costituiti da cellule T CD4⁺ della mucosa che rappresentano la probabile fonte di diffusione virale dopo l'infezione iniziale. Nei soggetti infetti sono stati ritrovati sia i virus X4-tropici che gli R5-tropici ma anche i *dual-tropic*, ma gli isolati R5 sono la classe predominante nelle fasi precoci dell'infezione (Moore et al., 2004). Una spiegazione plausibile è data dal fatto che nelle cellule di Langerhans dell'epitelio, si ha l'espressione del co-recettore CCR5 e non il CXCR4. Un'altra spiegazione potrebbe derivare dalla presenza di fattori che limitano la penetrazione o la replicazione, o entrambi i processi, degli isolati X4 in tutti i siti di infezione.

Il microbici ideale dovrebbe essere una molecola efficace e sicura, non solo nei confronti dell'infezione da HIV ma anche di altre malattie a trasmissione sessuale,

incolore, inodore e che sia attiva appena applicata e che abbia un effetto che persiste a lungo. Alcune previsioni epidemiologiche indicano che il corretto utilizzo dei microbiciidi potrebbe diminuire consistentemente il numero delle infezioni, riducendo drasticamente la diffusione del virus (Smith et al., 2005 Foss et al., 2009).

I primi microbiciidi utilizzati mostravano attività detergenti che distruggevano la membrana di numerosi patogeni con la speranza di metterne a punto uno in grado di contrastare anche HIV. Nonostante i rischi dell'utilizzo di detergenti come microbiciidi fossero già emersi dal trial clinico del detergente di prima generazione Nonoxinolo-9 (N-9), altri detergenti, di seconda generazione, come il Savvy (un gel vaginale all'1% di C31G, Cellegy Pharmaceuticals), sono in fase III dei trial clinici.

Dal momento che un ambiente con pH 4,5 inattiva HIV, sono in corso di sviluppo anche degli agenti acidificanti; tra questi la formulazione gel tamponata, BufferGel; ReProtect (Mayer et al., 2001) è in fase III dei trial clinici.

Sono stati proposti come microbiciidi alcuni inibitori della trascrittasi inversa, tra questi l'analogo nucleosidico Tenofovir, che previene la trasmissione verticale madre-figlio ed è utilizzato nelle strategie di profilassi pre- e post-esposizione.

Un'altra strategia prevede di interferire con l'interazione tra l'envelope virale, con cariche positive, e la superficie della cellula ospite, con cariche negative. Le sostanze polianioniche, come il PRO 2000 (Indevus Pharmaceuticals), il solfato di cellulosa (Ushercell; Polydex Pharmaceuticals) e la carragenina (Carraguard; Population Council), utilizzate come microbiciidi hanno fallito nel dimostrare una effettiva efficacia contro l'infezione (Van Damme, 2008 Skoler-Karpoff, 2008)

Anche gli zuccheri partecipano all'evasione virale dai meccanismi di difesa della cellula ospite; infatti, i glicani ricchi di mannosio sull'envelope virale rappresentano i target di numerose lectine, con azione anti-HIV (Balzarini et al., 1992 Hansen et al., 1989), e di 2G12, un anticorpo umano monoclonale che neutralizza un'ampia gamma di ceppi di HIV-1 (Calarese et al., 2003). Tra le lectine, occupa un posto di rilievo la Cianovirina-N (CV-N, Cellegy Pharmaceuticals), una proteina di 11 kDa isolata dal cianobatterio *Nostoc ellipsosporum* (Boyd et al., 1997), che inibisce l'ingresso sia di isolati X4 che R5, sia del SIV. Molto presto, però sono emersi mutanti resistenti che hanno perso il target e che quindi non rispondono più alla terapia.

Un altro farmaco candidato come microbicida è l'Enfuvirtide che inibisce la fusione tra le membrane cellulari e virali, impedendo l'ingresso del virus nella cellula ospite. Ma

anche qui si ha la selezione di mutanti resistenti se somministrato come soluzione iniettabile in soggetti infetti da HIV-1 (Greenberg et al., 2004).

I primi dati incoraggianti riguardo l'efficacia dell'utilizzo dei microbici, sono stati ottenuti dallo studio CAPRISA 004, in cui si valutava l'efficacia di un gel contenente Tenofovir, applicato a livello topico sulla mucosa vaginale. I dati dimostrano che l'utilizzo del microbicida così formulato, riduce l'infezione da HIV-1 del 39%.

Allo stesso modo, l'assunzione per via orale del Truvada, un'associazione farmacologica tra il tenofovir disoprixil fumarato ed emtricitabina, come chemioprolifassi pre-esposizione, riduce del 44% la trasmissione di HIV (Grant et al., 2010). Questi dati però non sembrano essere confermati da altri studi come il VOICE o il FEM PrEp *study*, probabilmente a causa della scarsa aderenza alla terapia da parte dei soggetti arruolati (Marrazzo et al., 2015 Agot et al., 2015).

Tutti questi dati hanno determinato lo sviluppo di numerosi microbici con attività antiretrovirale che interferiscono con fasi specifiche del ciclo replicativo virale. In particolare i target più promettenti sono rappresentati dalle fasi di *entry* e di *reverse transcriptase*. Gli inibitori dell'*entry* virale, in particolare quelli diretti contro il legame CD4/gp120, sono considerati degli alleati vincenti nel campo dei microbici, soprattutto perché agiscono indipendentemente dal tropismo virale.

Studi precedenti con BMS-378806, dendrimeri, CADA e con peptidi mimetici mini CD4 hanno dimostrato un forte effetto inibitorio su HIV, sia in vitro che su modelli di cellule vaginali di primati non umani trattati con SHIV163P3, rendendo quindi ipotizzabile l'utilizzo di queste molecole come microbici (Lin et al., 2003 Vermeire et al., 2004 Sepulveda et al., 2015 Bon et al., 2013 Srivastava et al., 2008 Dereuddre-Bosquet et al., 2012 Martin et al., 2008).

Inoltre è stato ipotizzato che un trattamento combinato di due o più farmaci che agiscono su fasi diverse del ciclo replicativo virale, potrebbe aumentare l'effetto antivirale e inibire con successo la trasmissione di HIV. Questa strategia mostra diversi vantaggi, infatti oltre a colpire diverse fasi del ciclo, l'utilizzo in combinazione permette la somministrazione del farmaco a dosi minori, quindi con notevoli vantaggi da un punto di vista dalla tossicità, ma anche riduce la possibile insorgenza di ceppi resistenti.

TESSUTO OSSEO

Il **tessuto osseo** è il tessuto costitutivo principale di quasi tutto lo scheletro e forma, inoltre, la dentina e il cemento dei denti. Rappresenta una forma specializzata di tessuto connettivo, caratterizzata dalla mineralizzazione della matrice extracellulare che conferisce al tessuto una notevole durezza e resistenza. Nonostante queste caratteristiche di durezza e resistenza alla pressione e alla trazione, l'osso è molto leggero: questa associazione tra la massima resistenza con il minimo peso è uno degli attributi più importanti.

Lo scheletro osseo costituisce l'impalcatura interna del corpo, protegge i visceri e le altre parti molli e dà inserzione ai muscoli e ai tendini; inoltre, accoglie nelle sue cavità gli elementi emopoietici del midollo. Oltre a queste funzioni meccaniche, il tessuto osseo è uno dei principali attori nel processo di mantenimento dell'omeostasi del calcio. Infatti, le ossa, rappresentano la principale sede di deposito da cui lo ione è continuamente mobilizzato per il mantenimento dell'equilibrio omeostatico nell'organismo.

L'osso è composto da cellule immerse in una sostanza extracellulare calcificata. Questa matrice è costituita da una componente fibrosa, per la maggior parte formata da collagene di tipo I, e da una sostanza amorfa, fatta di proteoglicani contenenti catene di condroitin-solfato e cheratan-solfato, in cui sono presenti alcune glicoproteine quali l'osteonectina, l'osteopontina e le sialoproteine.

Nell'embrione le fibre di collagene della matrice intercellulare ossea si intrecciano o si dispongono in fasci paralleli, assumendo una struttura tipica di quello che viene definito **osso non lamellare**, nell'adulto, invece, il tessuto osseo è organizzato in lamelle, ovvero piccole strutture appiattite nelle quali si dispongono le cellule, le fibre di collagene e la matrice intercellulare, che costituiscono l'**osso lamellare**. Queste lamelle hanno un diverso orientamento e collegandosi tra loro costituiscono una struttura di aspetto spugnoso (osso spugnoso o trabecolare), oppure possono disporsi parallelamente l'una accanto all'altra, formando una struttura compatta (osso compatto).

La matrice inorganica è costituita principalmente da fosfato e carbonato di calcio e rappresenta il 65% del peso secco dell'osso.

Organizzazione macroscopica delle ossa lamellari

Le ossa lamellari, in base alla loro organizzazione macroscopica possono essere suddivise in due tipi di osso: l'**osso spugnoso**, che delimita la cavità midollare, e l'**osso compatto** o denso, che costituisce la parte esterna, più addensata. L'osso spugnoso ha un aspetto alveolare ed è costituito da sottili **trabecole o spicole**, formate da lamelle addensate, che si ramificano e si anastomizzano in una rete tridimensionale nelle cui maglie è accolto il midollo osseo. Queste cavità midollari costituiscono spazi intercomunicanti che comunicano, nel caso delle ossa lunghe, con la cavità midollare della diafisi.

L'osso compatto, invece, all'esame macroscopico, appare sotto forma di una massa solida continua. Con poche eccezioni, sia la forma compatta che quella spugnosa sono presenti in tutte le ossa, ma variano considerevolmente da osso a osso, la distribuzione e il rapporto tra le due diverse strutture.

Nelle **ossa lunghe**, come il femore o l'omero, la **diafisi** appare come un cilindro cavo la cui parete è formata principalmente da osso compatto che circonda un'ampia cavità midollare centrale longitudinale, contenente il **midollo osseo**, mentre l'osso spugnoso è presente solo nello strato più interno che delimita direttamente la cavità midollare.

Le **epifisi** delle ossa lunghe e la maggior parte delle ossa corte sono formate da osso spugnoso ricoperto da un sottile strato periferico di osso compatto. Le ossa piatte del cranio sono costituite da due strati superficiali di osso compatto denominati rispettivamente **tavolati esterno ed interno**, che racchiudono uno strato profondo di osso spugnoso, il **diploe**.

Nell'organismo in accrescimento l'epifisi e la diafisi sono tra loro separate dalla cosiddetta cartilagine di coniugazione o **cartilagine epifisaria**, e la zona di transizione tra epifisi e diafisi è denominata **metafisi**. La cartilagine epifisaria e l'adiacente metafisi costituiscono la zona di accrescimento in lunghezza delle ossa lunghe che termina quando anche la cartilagine epifisaria si ossifica, arrestando così, lo sviluppo in altezza dell'individuo.

In corrispondenza delle superfici articolari delle epifisi delle ossa lunghe vi è uno strato di cartilagine ialina, denominata **cartilagine articolare** o di incrostazione, che non è soggetta a fenomeni di ossificazione.

Le ossa lunghe sono rivestite dal **periostio**, una sottile lamina connettivale fibroelastica, riccamente vascolarizzata, assente in corrispondenza delle cartilagini articolari e nelle zone di inserzione dei tendini e dei legamenti.

La cavità midollare della diafisi e quella dell'osso spugnoso sono rivestite da una sottile membrana connettivale, l'**endostio**, che riveste anche i canali vascolari dell'osso, i canali di Havers e i canali di Volkmann. Periostio ed endostio sono dotati di potenzialità osteogeniche, cioè sono in grado di formare tessuto osseo.

Istofisiologia dell'osso

Lo scheletro osseo, oltre alle funzioni meccaniche, svolge un ruolo importante nel ricambio del **calcio** e del **fosforo**. L'osso costituisce la principale riserva di calcio dell'organismo e tra questo e il sangue si verifica un continuo scambio di calcio per mantenere costante la concentrazione ematica dello ione.

I meccanismi che intervengono in tale processo sono quelli operanti nella calcificazione e nel riassorbimento dell'osso ad opera degli osteoclasti durante l'osteoclasogenesi.

Il continuo rimodellamento dello scheletro adulto, quindi, oltre ad un significato prettamente meccanico, ha un'importante funzione metabolica in quanto serve a mobilizzare il calcio dall'osso mantenendo costante la sua concentrazione ematica.

L'equilibrio del calcio nell'organismo è controllato dall'**ormone paratiroideo** (paratormone o PTH) che agisce regolando la liberazione del calcio mediante **osteolisi osteoclastica** seguita da deposizione di nuovo tessuto osseo. Questo ricambio fisiologico si verifica preferenzialmente nell'osso spugnoso, dove la velocità di ricambio è più elevata.

In seguito a stimolazione paratiroidea, gli osteociti e gli osteoclasti si arricchiscono di lisosomi che liberano i loro enzimi litici nella matrice ossea circostante. L'azione dell'ormone paratiroideo è controbilanciata da un ormone ad azione antagonista, la **calcitonina**, prodotto dalla tiroide. Anche gli ormoni sessuali intervengono regolando la velocità di maturazione dello scheletro e la chiusura dell'epifisi. Nei casi di pubertà precoce la maturazione dello scheletro è accelerata, mentre l'accrescimento si arresta per la prematura chiusura dell'epifisi.

Lo sviluppo delle ossa è anche influenzato da vitamine (A, C, D), dall'ormone della crescita o somatotropo (prodotto dal lobo anteriore dell'ipofisi) e dall'ormone tiroideo. Per esempio, l'ipofisectomia in giovane età provoca un ritardo dell'accrescimento delle

cartilagini epifisarie arrestando lo sviluppo che può essere ripristinato attraverso la somministrazione dell'ormone somatotropo.

La **tiroxina** favorisce la maturazione dello scheletro senza intervenire nel suo accrescimento. La **vitamina A**, probabilmente, interviene nella proliferazione delle cartilagini epifisarie, poiché la sua deficienza provoca una riduzione di spessore delle cartilagini di coniugazione e un rallentamento dell'accrescimento scheletrico.

La mancanza di **vitamina C** provoca una riduzione della produzione di collagene e dei costituenti della matrice amorfa con conseguente ritardo nell'accrescimento dello scheletro. La carenza cronica di **vitamina D** o di **calcio** nella dieta determina una condizione patologica che nel bambino viene definita rachitismo e nell'adulto osteomalacia, dove si osserva una parziale o mancata calcificazione del tessuto osteoide. Negli individui anziani, una serie di condizioni, tra cui un alterato ricambio ionico, la deficienza di ormoni sessuali e disturbi tiroidei, determina una accelerazione dei fenomeni di riassorbimento che non sono controbilanciati da una parallela deposizione di nuovo tessuto osseo. Nell'osso compatto questo fenomeno si manifesta con la comparsa di numerose cavità di riassorbimento e con l'allargamento della cavità midollare, che determinano l'insorgenza di osteopenia e successiva osteoporosi.

Componente cellulare del tessuto osseo

Nel tessuto osseo ritroviamo tre tipi di cellule che derivano tutte da un unico precursore comune ma che una volta differenziate assumono morfologia e funzioni specifiche, molto diverse tra di loro.

Tra queste troviamo gli osteoblasti, gli osteociti e gli osteoclasti.

Osteoblasti

Gli osteoblasti derivano da un precursore mesenchimale e possiamo distinguere quattro diversi stadi differenziativi: pre-osteoblasto, osteoblasto, osteocita e cellule delimitanti l'osso. In tutti e quattro gli stadi differenziativi troviamo cellule positive per la fosfatasi alcalina ma solo l'osteoblasto maturo è in grado di produrre tessuto mineralizzato (Aubin et al., 1996) ed è caratterizzato da una morfologia cuboidale e da una forte positività alla fosfatasi alcalina. Il principale gene che codifica per una proteina coinvolta nel differenziamento in senso osteoblastico è rappresentatao dal fattore

trascrizionale Runx-2 (Runt related transcription factor2, cbfa-1) (Carbonare et al., 2012). Gli osteoblasti si localizzano sulla superficie dell'osso a livello dell'unità di rinnovamento osseo, e secernono collagene di tipo I, osteocalcina e fosfatasi alcalina, che è essenziale per la deposizione minerale (Clarke et al., 2008).

Gli osteoblasti regolano positivamente l'osteogenesi, producendo una caratteristica matrice extracellulare a base di collagene che successivamente viene mineralizzata, grazie alla deposizione di cristalli di idrossiapatite.

Gli osteoblasti maturi attivi che sintetizzano la matrice hanno grandi nuclei, apparati del Golgi ingrossati e un esteso reticolo endoplasmatico.

Le popolazioni di osteoblasti sono eterogenee, con osteoblasti diversi che esprimono diversi pattern di geni. Questo potrebbe spiegare l'eterogeneità della microarchitettura che caratterizza l'osso trabecolare in diverse regioni dello scheletro, differenze anatomiche sito-specifiche in caso di particolari patologie e diversa risposta degli stessi ai diversi farmaci utilizzati per le malattie legate all'osso.

Osteociti

Gli **osteociti** sono le cellule mature dell'osso: sono essenzialmente osteoblasti che, dopo aver elaborato la sostanza ossea, rimangono imprigionati nella matrice calcificata segregandosi come cellule singole all'interno di lacune ossee. Dalla lacuna si diramano in tutte le direzioni dei sottili **canalicoli** dentro i quali sono accolti i processi citoplasmatici dell'osteocita. Questi processi vengono in contatto tra di loro unendo così i vari osteociti mediante giunzioni gap, attraverso le quali avviene uno scambio di ioni e piccole molecole. I canalicoli contengono anche fluido extracellulare che porta nutrienti e metaboliti.

Gli osteociti si adattano alla forma della loro lacuna, hanno un nucleo appiattito e il citoplasma presenta uno scarso reticolo endoplasmatico rugoso e un piccolo apparato del Golgi.

Gli osteociti sono anche implicati nella **meccano-trasduzione**, poiché rispondono a stimoli provocati da forze tensorie applicate all'osso, rilasciando adenosina monofosfato ciclico (cAMP), osteocalcina e fattore di crescita simil-insulina. Il rilascio di questi fattori facilita l'attività dei preosteoblasti nel rimodellamento dello scheletro non solo durante la crescita e lo sviluppo ma anche durante la redistribuzione delle forze che agiscono sullo scheletro. L'intervallo tra il plasmalema degli osteociti e le pareti delle

lacune e dei canalicoli, noto come **spazio periosteocitico**, è occupato da liquido extracellulare.

L'osteocita non è tuttavia uno stadio differenziativo terminale, in quanto nel processo di riassorbimento dell'osso può riprendere le funzioni osteogenetiche assumendo di nuovo la forma di osteoblasto, oppure al contrario, fondendosi con altri osteociti, può dare origine ad un osteoclasto polinucleato.

Osteoclasti

Gli osteoclasti, le uniche cellule in grado di effettuare il processo di riassorbimento osseo, sono cellule giganti multinucleate che si formano in seguito alla fusione di progenitori mononucleati della linea monocito-macrofagica, durante l'osteoclastogenesi (Teitelbaum et al., 2000). Sono caratterizzate da una morfologia e caratteristiche fenotipiche che vengono utilizzate per l'identificazione, quali la multinuclearità, l'espressione della fosfatasi acida tartrato resistente (**TRAP**) e la presenza, sulla loro superficie, di recettori per la calcitonina. Il differenziamento di queste cellule coinvolge tutte le cellule della linea osteoblastica che esprimono RANKL (NF-kB ligand) e il M-CSF (Macrophage Colony Stimulating factor) (Tietelbaum et al., 2000). Questo processo inoltre è regolato da una citochina che funge da recettore esca, l'osteoprotegerina (**OPG**), poiché si lega a RANKL sequestrandolo e impedendo quindi il legame al suo recettore (Yasuda et al., 1998). Proprio l'equilibrio tra RANKL/OPG regola i fenomeni di riassorbimento e formazione dell'osso e uno squilibrio a questo livello è implicato nella patogenesi di numerose malattie legate all'osso (Hofbauer et al., 2001) come osteopenia e osteoporosi.

Rimodellamento osseo

Durante la fase di rimodellamento osseo intervengono due tipi cellulari: le cellule della linea osteoblastica (osteoblasti, osteociti e cellule di rivestimento) e gli osteoclasti, responsabili del riassorbimento. Queste cellule, insieme ai loro precursori e altre cellule associate (cellule endoteliali e del sistema nervoso) sono organizzate in unità specializzate chiamate **BMU** (*bone remodelling unit*) e rappresentano gli attori protagonisti nel processo di rimodellamento. Il rimodellamento osseo permette di

mantenere la robustezza dell'osso e l'omeostasi minerale, prevenendo l'accumulo di microlesioni. Questo meccanismo implica la continua rimozione di minime porzioni di osso danneggiato da microfratture e la sostituzione di questo con porzioni di nuova matrice proteica, seguita dalla mineralizzazione di quest'ultima per formare l'osso nuovo (Kassem et al., 2008).

Fasi del rimodellamento osseo

In condizioni fisiologiche il processo di rimodellamento osseo dura circa 200 giorni: la fase di formazione di nuovo osso è la più lunga (circa 150 giorni) a differenza della fase di riassorbimento che richiede circa 2-4 settimane (Hernandez et al., 1999). Il processo di rimodellamento avviene a livello delle BMU che sono costituite dagli osteoclasti che riassorbono l'osso, gli osteoblasti che lo sostituiscono con osso di nuova formazione, gli osteociti dentro la matrice, le cellule delimitanti l'osso che coprono la superficie dell'osso e dal flusso sanguigno capillare.

Il processo di rimodellamento segue una serie di fasi distinte e sequenziali:

QUIESCENZA – ATTIVAZIONE – RIASSORBIMENTO – INVERSIONE - FORMAZIONE

Quiescenza: in questo stadio le cellule delimitanti l'osso si localizzano sulla superficie dell'osso, sopra uno strato di tessuto osteoide. Queste cellule hanno sulla loro superficie recettori per una vasta gamma di sostanze che possono fungere da attivatori del riassorbimento osseo, che ha inizio nello strato superficiale del tessuto osteoide che ricopre l'osso, che in questo modo si trova esposto alla fase successiva.

Attivazione: in questa fase i precursori delle cellule osteoclasti, attraverso un richiamo chemiotattico, giungono al sito di attivazione per via ematica, tramite i canali di Havers e di Volkmann, e si legano alla matrice ossea grazie all'interazione tra le integrine presenti sulla membrana di queste cellule con le proteine della matrice (osteopontina, osteonectina e osteocalcina) che contengono il pattern RGD (arginina, glicina, aspartato).

Riassorbimento: questa fase è finemente regolata dal rapporto tra RANKL/OPG, IL-1, IL-6, M-CSF, 1,25-diidrossivitamina D, l'ormone paratiroideo (PTH) e la calcitonina (Boyle et al., 2003 Blair et al., 2004). Gli osteoclasti secernono ioni H⁺ nel compartimento di riassorbimento, attraverso la pompa protonica H⁺-ATPase e canali per il cloro presenti sulla membrana, in modo da abbassare il pH fino a 4.5 per facilitare il distacco del minerale (Silver et al., 1988). Inoltre, gli osteoclasti secernono, attraverso lisosomi citoplasmatici (Delaissè et al., 2003), fosfatasi acide tartrato resistenti (**TRAP**), catepsina K (CATHK), metallo proteinasi della matrice (MMP9) e gelatinasi, in modo da digerire la matrice organica e le sue componenti proteiche.

Inversione: questa fase rappresenta l'intervallo di tempo che va dal completamento della fase di riassorbimento all'inizio della fase di formazione. Gli osteoclasti vanno incontro ad apoptosi mentre i pre-osteoblasti sono attirati alla base della lacuna di riassorbimento da stimoli di natura chemiotattica, vi aderiscono, proliferano e iniziano a differenziare (Matsuo et al., 2008). Contemporaneamente si osserva la comparsa di fagociti mononucleati che sembrano avere il ruolo di attenuare la rugosità superficiale lasciata dai processi di riassorbimento e vengono rilasciate alcune proteine della matrice come ad esempio il TGF-beta, che esercita un'azione inibitoria sulla produzione di RANKL, diminuendo quindi l'azione di riassorbimento degli osteoclasti. Inoltre, in seguito alla scomparsa degli osteoclasti, le cellule delimitanti l'osso penetrano nella lacuna e rimuovono i frammenti della matrice ossea rimasti. Questa sorta di "pulizia" è un prerequisito fondamentale per la successiva deposizione del primo strato di proteine nel punto di riassorbimento e si forma una linea adesiva di glicoproteine che facilita l'attacco degli osteoblasti (Everts et al., 1995 Gallagher et al., 2010)

Formazione: questa fase è la più lunga dell'intero processo ed è più lenta rispetto alla fase di riassorbimento. Il TGF-beta sembra essere il fattore chiave per il reclutamento di cellule staminali mesenchimali nel sito di riassorbimento dove raggiungono lo stadio differenziativo finale. Gli osteoblasti cominciano a sintetizzare nuova matrice organica ricca di collagene e regolano la mineralizzazione della matrice rilasciando piccole vescicole che concentrano gli ioni calcio e fosfato e distruggono gli inibitori della mineralizzazione, come pirofosfati o proteoglicani (Anderson et al., 2003).

Gli osteoblasti circondati e immersi nella matrice differenziano in osteociti e tramite una estesa rete di canalicoli, sono collegati tra di loro e alla superficie dell'osso (Burger

et al., 2003). Completata la formazione di nuovo osso il 50-70% degli osteoblasti va in apoptosi, il restante differenzia in osteociti o cellule delimitanti l'osso. In questi casi le cellule mantengono la capacità di ri-differenziare in osteoblasti in seguito a stress meccanico o sotto l'impulso dell'ormone paratiroideo (Dobnig et al., 1995).

HIV E METABOLISMO OSSEO

Un numero significativo di soggetti con infezione da HIV-1 mostra una riduzione della densità di massa ossea (**BMD** - Bone Mass Density), con conseguenti fenomeni di ipovitaminosi D nelle prime fasi di infezione, che possono sfociare in condizioni di osteopenia e osteoporosi nelle fasi più avanzate dell'infezione.

Da uno studio di meta analisi del 2006 si evince che i soggetti HIV positivi mostrano un aumento di rischio di sviluppo di osteoporosi 3,7 volte maggiore rispetto ai soggetti sieronegativi (Brown and Qaqish AIDS 2006).

L'osteoporosi è una malattia sistemica a eziologia multifattoriale caratterizzata da una riduzione della resistenza ossea, con deterioramento della micro-architettura del tessuto, che porta a un'aumentata fragilità scheletrica, con conseguente aumento del rischio di frattura, anche spontanea o da trauma minimo.

Sebbene l'osteoporosi sia una malattia sistemica e quindi tutte le ossa siano più fragili, le tipiche fratture osteoporotiche sono quelle dei corpi vertebrali, dell'epifisi prossimale del femore e dell'avambraccio distale.

Nei soggetti sieropositivi, l'eziopatogenesi della malattia è da ricondurre all'azione osteotossica del virus che ha la capacità di interferire sull'omeostasi cellulare, alterando il *cross-talk* tra osteoblasti e osteoclasti spostando l'equilibrio a favore di questi ultimi, favorendo quindi il riassorbimento osseo (FIG. 9).

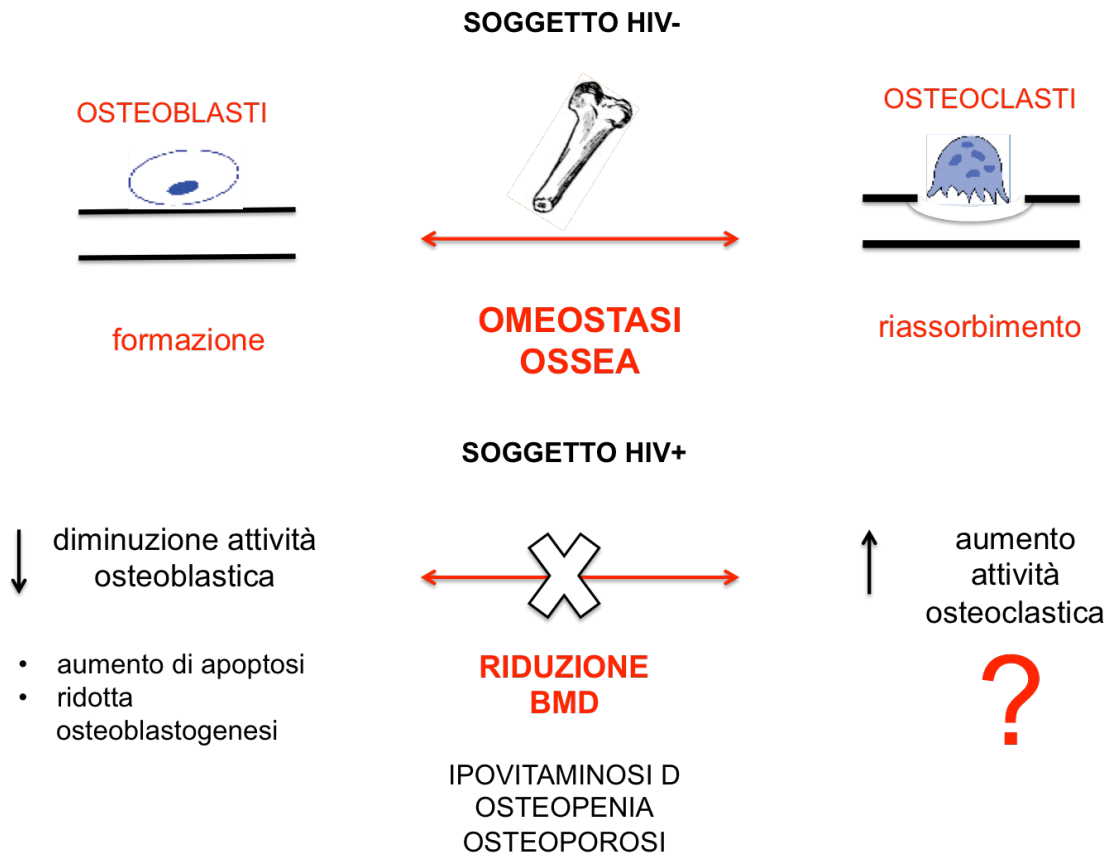


Figura 9: Omeostasi ossea in soggetti sani e in soggetti sieropositivi

Questo delicato equilibrio di *cross-talk* biologico tra osteoblasti e osteoclasti è inoltre regolato a sua volta da un corretto equilibrio dell'azione di alcuni ormoni, dal metabolismo del calcio e dalla presenza di vitamine e citochine.

Ma un altro attore protagonista responsabile di queste alterazioni è rappresentato dai farmaci impiegati nella terapia antiretrovirale cART, che a volte può eccedere l'azione osteotossica del virus stesso.

Osteoblasti: ruolo del virus

Nelle cellule osteoblastiche HIV, sebbene non sia in grado di generare un'infezione produttiva, poiché i livelli di espressione dei recettori chemochinici sulla superficie cellulare, sono bassi e variabili (Yano et al., 2005), determina un aumento dell'apoptosi inibendo, di conseguenza, l'attività osteogenica.

Considerata la non permissività di queste cellule all'infezione da HIV-1, il fenomeno di induzione dell'apoptosi è innescato dalla interazione tra la proteina virale gp120 e la membrana cellulare che induce la secrezione di TNF α . Il TNF α è una citochina multifunzionale prodotta principalmente dai macrofagi attivati, dai linfociti ma anche da osteoblasti e osteoclasti. Il TNF α solubile rappresenta la proteina matura secreta da osteoblasti e osteoclasti che media il riassorbimento osseo attraverso un'azione sia autocrina che paracrina (Abu-Amer et al., 2000 Bu et al., 2003). Gli effetti biologici si esplicano in seguito al legame con i recettori di membrana TNFR I e II che media la maggior parte delle proprietà biologiche di TNF α , come l'attivazione di NF-kB e l'induzione dell'apoptosi (Gibellini et al., 2008). La secrezione di TNF α HIV-1 indotta da parte degli osteoblasti e la concomitante alta produzione di TNF α nei linfociti T nel corso dell'infezione può quindi promuovere un progressivo deterioramento del microambiente osseo, che contribuisce alla patogenesi dell'osteopenia e osteoporosi associata a HIV-1. Inoltre la glicoproteina virale gp120 provoca l'inibizione della proteina Runx-2 e l'attivazione del PPAR γ (peroxisome proliferator-activatedreceptor gamma) che sposta il differenziamento delle cellule mesenchimali in senso adipogenico.

Osteoblasti: ruolo dei farmaci

I pazienti trattati con cART presentano, rispetto ai *naive*, una maggiore prevalenza di osteopenia/osteoporosi, che risulta essere ancora più evidente con l'uso di alcuni farmaci. Uno dei costituenti fondamentali del *backbone* della terapia antiretrovirale è rappresentato dai farmaci nucleosidici inibitori della trascrittasi inversa virale (NRTI), che però ha un'azione inibitoria anche sulla DNA polimerasi γ , responsabile della replicazione del DNA mitocondriale (mtDNA). Questo causa una deplezione del mtDNA e di conseguenza un grave danno funzionale nei mitocondri che si estrinseca attraverso una ridotta incorporazione del piruvato nel ciclo di Krebs che viene convertito in acido lattico. Tutto questo ha notevoli ripercussioni sul compartimento osseo, poiché in condizioni di acidosi acuta l'osso è chiamato a svolgere molteplici azioni al fine di ridurre il carico acido. Infatti, in situazioni di acidosi cronica, vengono attivati i meccanismi del rimodellamento osseo con incremento dell'attività osteoclastica al fine di mobilizzare un numero considerevole di tamponi ossei,

compreso il calcio, producendo quindi una progressiva riduzione della densità minerale ossea (Carr et al., 2001). Il tenofovir invece, pur facendo parte della stessa classe di farmaci antiretrovirali, ha un'azione inibitoria a livello della DNA polimerasi γ , ma può produrre comunque un danno osseo attraverso meccanismi eziopatogenetici diversi, come ad esempio la riduzione del GFR (*glomerular filtration rate*). Con la riduzione del GFR si riduce l'attività dell'alfa-1 idrossilasi renale, che si traduce in una ridotta produzione di 1,25(OH)₂-vitamina D, in una tossicità tubulare (ipofosfatemia e iperfosfaturia), e in una aumentata attività osteoclastica supportata dall'aumento dei marcatori del *turnover* osseo. Tutte queste conseguenze sono in grado di indurre la deplezione dei fosfati, l'osteomalacia e la perdita di massa ossea (Reynes et al., 2013). Nello studio BICOMBO (Martinez et al., 2009) si assiste ad una riduzione di osteoprotegerina nel braccio con il tenofovir ed un aumento della stessa in quello con abacavir. Un'altra classe di farmaci antiretrovirale è rappresentata dagli inibitori della proteasi, farmaci che possono contribuire al danno osseo. Infatti, in numerosi studi è stata descritta un'aumentata prevalenza di osteopenia nei pazienti trattati con questi farmaci, rispetto a quelli in terapia con gli inibitori della trascrittasi inversa (Tebas et al., 2000). Inoltre i soggetti trattati con i PI c'è un rischio di osteoporosi 1,6 volte maggiore rispetto ai pazienti che non assumono questi farmaci (Brown et al., 2006). Una delle azioni potenzialmente negative dei PI è data dalla capacità di inibire l'attività enzimatica dei citocromi P450, implicati nel metabolismo della vitamina D, favorendo l'insorgenza di fenomeni di ipovitaminosi D. In particolare, la 25(OH)- e la 1,25(OH)-idrossilasi, promuovono la conversione, rispettivamente, di colecalciferolo in 25(OH)-vitamina D, a livello epatico, e la produzione renale di 1,25(OH)₂-vitamina D, detta anche calcitriolo. Infatti, in circa il 54% delle persone con infezione da HIV si osserva una carenza di vitamina D e addirittura, il 7% mostra un deficit assoluto della stessa (Vescini et al., 2011).

OBIETTIVO DELLA TESI

La comparsa della terapia antiretrovirale (cART) nel trattamento dell'infezione da HIV ha determinato una profonda revisione del *management* clinico e farmacologico del paziente HIV positivo. Infatti, l'impiego della cART ha trasformato l'infezione da HIV da una malattia che evolveva invariabilmente verso l'*exitus* del paziente a una patologia con decorso di tipo cronico. Per questo motivo, mentre prima dell'era cART il clinico concentrava il suo interesse quasi esclusivamente sui problemi, ancora oggi fondamentali, relativi al monitoraggio del sistema immunitario, alla concentrazione virale nel sangue e alla comparsa di infezioni opportunistiche, ora deve considerare con sempre crescente attenzione le lesioni ai vari organi e tessuti correlate sia all'infezione da HIV sia alla tossicità relativa al trattamento antiretrovirale (Borderi et al., 2009 Womack et al., 2011). In particolare, le lesioni a carico del sistema nervoso centrale, del rene, del sistema cardiovascolare e dell'osso, giocano un ruolo clinico sempre più importante durante l'infezione da HIV, e quindi sono ampiamente considerate con grande attenzione dai clinici durante il monitoraggio dei pazienti sieropositivi.

Una particolare importanza rivestono le lesioni a carico del tessuto osseo poiché tutti i soggetti sieropositivi hanno un rischio di sviluppare osteoporosi 3,7 volte maggiore (Brown and Qaqish, 2006) rispetto alla popolazione generale, dovuto al fatto che in questi soggetti, si osserva una precoce riduzione dei livelli di densità minerale di massa ossea. La perdita di *Bone Mass Density* (BMD) è correlata alla perdita dell'equilibrio funzionale, nella *Bone Forming Unit* (BFU), caratterizzato dalla fine regolazione che normalmente intercorre tra l'azione trofica degli osteoblasti e l'azione di riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti (Brown et al., 2006 Ofotokun et al., 2012).

Numerosi lavori (Cotter et al., 2007 Gibellini et al., 2007-2008 Grassi et al., 2013) hanno dimostrato come HIV e la terapia, siano in grado di determinare l'alterazione di questo equilibrio attraverso un'azione negativa diretta sulle cellule della linea osteoblastica. Per quanto riguarda il compartimento osteoclastico invece sono disponibili poche e contrastanti informazioni.

Quindi lo scopo della prima parte della tesi è quello di studiare l'effetto indotto dal virus e dalla terapia antiretrovirale sulle cellule della linea osteoclastica, per capire se la riduzione di massa ossea sia dovuta ad un lavoro in concerto su entrambi i protagonisti

della regolazione dell'omeostasi ossea o se l'unico compartimento intaccato sia quello delle cellule osteoblastiche.

A questo scopo abbiamo analizzato, nel primo set di esperimenti, gli effetti del virus e, in particolare della proteina Tat, sul differenziamento osteoclastico *in vitro*.

Inoltre, per valutare il contributo apportato dalla terapia, abbiamo allestito un altro set di esperimenti per verificare l'effetto prodotto dai surnatanti cellulari di linfociti T isolati da soggetti sieropositivi, sul differenziamento osteoclastico.

I risultati ottenuti mostrano che il virus e la terapia intensificano il differenziamento di monociti in senso osteoclastico, favorendo quindi il processo di riassorbimento osseo, che potrebbe contribuire alla perdita della densità di massa ossea.

L'analisi della variazione dei livelli di BMD in soggetti sieropositivi, è stata valutata anche in corso di un sotto-studio del trial MODAT (*Monotherapy Once a Day with Atazanavir/r*) (Castagna, 2014), definito appunto OsteoMODAT.

Brevemente, OsteoMODAT (Spagnuolo, 2015) è stato messo a punto per valutare le variazioni di alcuni parametri (efficacia terapeutica, recupero immunologico ed effetti collaterali a carico del SNC e del compartimento osseo), su due popolazioni di pazienti distinti in base alla terapia assunta. Un braccio dello studio comprende i soggetti che abbandonano la classica triplice terapia per passare a un regime terapeutico basato su un solo farmaco (monoterapia con inibitori delle proteasi), mentre l'altro braccio comprende i soggetti che continuano ad assumere il regime terapeutico classico.

Per quanto riguarda il compartimento osseo, i dati ottenuti dallo studio OsteoMODAT, mostrano che anche *ex vivo* la citochina RANKL, assume un ruolo di attore principale.

Infatti, i livelli quantitativi di RANKL presenti al momento dell'inizio dello studio nel siero dei soggetti arruolati, sono correlati con la percentuale di perdita di massa ossea nel tempo.

Nonostante gli indubbi successi nel controllo della malattia, cART non si è dimostrata risolutiva: l'infezione persiste automantenendosi nei reservoir cellulari e, in diversi pazienti, si può osservare l'insorgenza di farmaco resistenza (Levy, 2009).

Questo scenario ha aperto la strada allo sviluppo di numerose ricerche volte all'identificazione di nuovi farmaci ad azione antiretrovirale, in attesa dell'allestimento di un efficace vaccino. In particolare, alcuni studi si sono focalizzati sull'utilizzo di molecole con proprietà antiretrovirali da impiegare a livello delle mucose genitali, con lo scopo di contrastare, o almeno ridurre, la trasmissione sessuale di HIV-1.

Nella seconda parte della tesi abbiamo testato l'efficacia di una molecola di nuova concezione, un mini CD4 chiamato M48U1, da solo o in combinazione, nel ridurre l'infezione da parte di alcuni ceppi di HIV-1 di riferimento e di isolati da pazienti.

Abbiamo scelto di utilizzare il Tenofovir in combinazione con il nostro mini CD4, perché l'utilizzo di un gel con Tenofovir all'1% (trial CAPRISA 004), permette di ridurre la trasmissione dell'infezione a livello delle mucose vaginale.

Dai risultati ottenuti possiamo asserire che M48U1 riduce drasticamente l'infezione di tutti i ceppi e di tutti gli isolati utilizzati, sia su un modello cellulare rappresentato dai PBMC che su un modello di cellule cervico-vaginali, e inoltre tale azione viene intensificata in presenza del Tenofovir.

MATERIALI E METODI

Prima parte: HIV E COMPARTIMENTO OSSEO

Isolamento PBMCs e monociti da donatori sani

I campioni di sangue periferico da donatori sani sono stati ottenuti dal reparto emocomponenti del Policlinico S. Orsola Malpighi, in accordo con la legislazione italiana regolamentata dal Decreto Legislativo 03-03-2005 (G.U. n°85 del 13-04-2005).

L'isolamento dei linfomonociti da sangue in toto (PBMCs) di donatori sani è stato effettuato su gradiente Ficoll (Ficoll-Histopaque, Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Dai PBMCs isolati, i monociti sono stati ottenuti tramite selezione negativa con il kit Human Monocyte Enrichment (EasySep, StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada), secondo il protocollo indicato dalla ditta.

La purezza dei monociti è stata valutata tramite tecniche di citometria, utilizzando l'anticorpo α -CD 14 FITC diluito 1:10 (Becton Dickinson, New Jersey, US).

Successivamente, i monociti sono stati seminati e mantenuti in coltura in terreno α -MEM + 10% FCS, alla concentrazione di $0,4 \times 10^5$ /mL.

Trattamento dei monociti di soggetti sani con la proteina Tat di HIV-1

Per valutare gli effetti di HIV-1 sul differenziamento dei monociti in senso osteoclastico, i monociti sono stati trattati con la proteina Tat del virus.

Al terreno di coltura dei monociti sono stati aggiunti il Macrophage Colony-Stimulating Factor (Recombinant Human M-CSF, 10 ng/mL PeproTech, Rocky Hill, USA) e la citochina RANKL, appartenente alla famiglia dei ligandi di TNF-kB (Recombinant Human RANKL, 50 ng/mL, PeproTech, Rocky Hill, USA) in combinazione con la proteina Tat di HIV. Ogni 3 giorni il terreno è stato parzialmente sostituito con terreno fresco contenente le due citochine più la proteina ricombinante Tat (100 ng/ml, Diatheva, Fano, Italia). Al fine di valutare l'effetto nel differenziamento virus-indotto, sono state utilizzate sia la proteina p24 virale (NIBSC, Londra, Inghilterra) sia la proteina Tat, inattivata al calore (100 ng/mL hiTAT, heat inactivated Tat, 65°C per 30 minuti). Al giorno 10 e al giorno 16 post-trattamento le cellule sono state lisate per

procedere all'estrazione dell'RNA (High Pure RNA Isolation Kit, Roche, Penzberg, Germania) e all'analisi dell'espressione genica in Real Time PCR.

Trattamento dei monociti di soggetti sani con surnatanti ottenuti da colture cellulari di soggetti sieropositivi

Per analizzare gli effetti della terapia sul compartimento osseo, abbiamo selezionato due distinti gruppi di soggetti HIV positivi: soggetti in terapia antiretrovirale e soggetti naive al trattamento.

I campioni di sangue di questi pazienti sono stati ottenuti dal reparto Malattie Infettive del Policlinico S. Orsola-Malpighi di Bologna ed i linfomonociti (PBMCs) sono stati isolati seguendo lo stesso protocollo sperimentale descritto per i donatori sani.

Dai PBMCs ottenuti sono stati isolati i linfociti T CD4+, tramite il kit EasySep Human CD4+ T Cell Enrichment (EasySep, StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada). Successivamente, le cellule T CD4+ sono state seminate in terreno RPMI1640, addizionato con il 10% di Fetal Calf Serum (FCS) e 2mM di L-glutammina ad una concentrazione di 5×10^5 cellule/mL e attivate per tre giorni, aggiungendo al terreno di coltura fitoemoagglutinina (PHA, 5 mg/mL; Sigma, St Louis, MO, USA) e interleuchina 2 (IL-2, 10 U/mL; Pierce, Rockford, IL, USA). Al giorno 4 post-semina, i surnatanti cellulari provenienti dalle colture dei TCD4+ dei pazienti sono stati recuperati e utilizzati per indurre il differenziamento osteoclastico dei monociti dei donatori sani.

Tale differenziamento è stato allestito seguendo diversi protocolli sperimentali:

- Differenziamento tradizionale con M-CSF (Recombinanti Human M-CSF, 10 ng/mL PeproTech, Rocky Hill, USA) e RANKL (Recombinant Human RANKL, 50 ng/mL, PeproTech, Rocky Hill, USA);
- Differenziamento con le due citochine in presenza di surnatanti ottenuti da colture di cellule di pazienti trattati e di pazienti naive alla terapia;
- Differenziamento in presenza del SOLO surnatante ottenuto da colture di cellule di pazienti trattati o di pazienti naive alla terapia;

Analisi espressione genica

Al giorno 10 e al giorno 16 post-trattamento è stata effettuata la lisi delle cellule per l'estrazione dell'RNA mediante il kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Penzberg, Germania) secondo il protocollo fornito dalla ditta.

La variazione dell'espressione dei geni per la Cathepsina K, la Fosfatasi Acida Tartrato Resistente e il recettore della Calcitonina R è stata valutata in Real Time utilizzando il kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (QIAGEN, Hilden, Germania), con il seguente profilo termico: step iniziale di 20 minuti di retrotrascrizione, denaturazione iniziale a 95°C per 15 minuti, 45 cicli di amplificazione (10 secondi a 95°C, 15 secondi a 60°C, 30 secondi a 72°C) e uno step finale di 2 secondi a 78°C, al termine del quale viene determinata la fluorescenza del SYBR green. I dati sono stati normalizzati rispetto al gene 18s ed analizzati dal software LightCycler (versione 3.5, Roche, Penzberg, Germania). L'analisi della curva di melting per i differenti primer utilizzati ha confermato la specificità dell'amplificazione di tutti i trascritti.

I primers utilizzati sono i seguenti: 18sF (5'-AGGAATTCCCAGTAAGTGCG-3') e 18sR (5'-GCCTCACTAAACCATCCAA-3') per il gene *housekeeping* 18s; per il gene della Cathepsina K, CATH1 (5'-TTCTGCTGCTACCTGTGGTG-3') e CATH2 (5'-GCCTCAAGGTTATGGATGGA-3'); per il gene della Fosfatasi Acida Tartrato Resistente (TRAP), i primer TRAP1 (5'-GTCCTGGCTCAAGAAACAGC-3') e TRAP2 (5'-GCCATTCTCATCTTGCAGGT-3'); per il gene del recettore della Calcitonina, i primer CALR1 (5'-TTCTTCCAGCCAAGAAGAGC-3') e il CALR2 (5'-GTCTAGGCTGGGACCCTTTC-3').

OsteoMODAT

Durante il sotto-studio OsteoMODAT sono stati arruolati 103 pazienti, suddivisi in due bracci:

- Gruppo destinato allo *Switch* a monoterapia con Atazanavir più *booster* di ritonavir (ATV/r)
- Gruppo destinato alla continuazione della cART tradizionale (ATV/r + 2 NRTI)

Il periodo di osservazione è durato 96 settimane, nell'arco del quale sono stati valutati marker virologici (RNA virale) e immunologici (cellule CD4+), le variazioni nel profilo lipidico e glucidico, le funzionalità renali, le performance neurocognitive e le alterazioni a carico del compartimento osseo (variazione BMD).

Alla 48° e 96° settimana, sono stati misurati i livelli di variazione della BMD rispetto al basale, attraverso la densitometria ossea a raggi X (DEXA), e i valori quantitativi di numerosi markers ossei nei sieri dei soggetti arruolati.

Calcolo BMD e quantificazione marker ossei

Le analisi di densitometria ossea a raggi X (DEXA Scan) e di quantificazione dei marker ossei sui 103 soggetti arruolati sono state eseguite al *baseline*, ossia al momento dell'inizio dello studio, e a 48 e a 96 settimane. I valori di BMD, T-score (rapporto tra la BMD del soggetto esaminato rispetto alla BMD media di una popolazione sana più giovane di 20 anni, età del massimo sviluppo) e Z-score (rapporto tra la BMD del soggetto esaminato rispetto alla BMD media delle persone aventi la stessa età), sono stati misurati a livello della colonna vertebrale (L1-L4) e nella zona del femore totale prossimale. Per la quantificazione dei marker ossei sono stati effettuati saggi ELISA per il dosaggio dell'Osteocalcina (Human Osteocalcin ELISA Kit, IDS, Boldon, UK), della vitamina D nella forma 25-OH (Human 25 Hydroxy Vitamin D3 ELISA Kit, IDS, Boldon, UK), della citochina RANKL, ligando di NFκB (Human TRANCE/RANK L/TNFSF11 DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN), dei livelli di Osteoprotegerina (Human Osteoprotegerin/TNFRSF11B DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN), del telopeptide carbossi-terminale del Collagene di tipo I (Serum Crosslaps (CTX-I) ELISA Immunoassay, IDS, Boldon, UK).

Seconda parte: STRATEGIE PREVENTIVE INNOVATIVE

Colture cellulari e preparazione stock virali

La linea cellulare T C8166 linfoblastoide CD4+ è stata mantenuta in coltura in terreno RPMI 1640 (Gibco, Paisley, UK) con il 10% di siero fetale di vitello inattivato con il calore (FCS, Gibco) e 2 mM di L-glutammina (Gibco) ad una concentrazione di 5×10^5 cellule/mL. Le cellule mononucleate da sangue periferico (PBMCs) dei donatori sani e di tre pazienti HIV-1 infetti sono state isolate su un gradiente Ficoll (Ficoll-Hystopaque,

Pharmacia, Uppsala, Sweden): i PBMCs sani sono stati seminati in terreno RPMI 1640 con il 10% di FCS ad una concentrazione di 1×10^6 cellule/mL, e attivati per 3 giorni con fitoemoagglutinina (PHA, 5 mg/mL, Sigma, St Louis, MO, USA) e IL-2 (100U/mL, Pierce, Rockford, IL, USA). Al giorno 4 è stata allestita la co-coltura tra i PBMCs sani attivati e i PBMCs da pazienti infetti (che avevano aderito allo studio in accordo con la Dichiarazione di Helsinki) in rapporto 1:1, al fine di isolare il virus dei pazienti. La co-coltura è stata mantenuta per 15 giorni con aggiunta di PBMCs attivati quando necessario e sostituzione parziale del terreno (RPMI 1640 con il 10% di FCS e 2 mM di L-glutamina e IL-2 (100U/mL) ogni 3 giorni. Per gli esperimenti sono stati impiegati sei ceppi HIV-1 di laboratorio con differente tropismo: HIV-1 IIIb (ceppo X4), HIV-1 Ada (ceppo R5 tropico), ARV-2 (R5 tropico), RU132 (R5/X4 tropico), Bal (tropismo R5), CBL4 (tropismo X4) acquistati dalla NIBSC (NIBSC, London, UK), e i tre ceppi isolati da pazienti, 1 paziente naive (AMBR5N, ceppo R5 tropico) e 2 pazienti trattati (ARR5X4 e CSBX4, rispettivamente R5/X4 e X4 tropici). Il tropismo virale degli isolati da paziente è stato determinato tramite il sequenziamento del loop V3 del virus, secondo il protocollo dello studio OSCAR (Svicher et al., 2010). Gli stock virali di laboratorio sono stati preparati in cellule C8166 nel caso del ceppo IIIb o in PBMCs attivati nel caso degli altri ceppi (Bon et al., 2013), mentre gli isolati da pazienti sono stati ottenuti in seguito a co-coltura con PBMCs da donatori sani (Gartner et al., 1990). Gli stock virali e gli isolati primari sono stati titolati mediante quantificazione ELISA della proteina virale p24 (kit HIV-1 gag p24 antigen, Biomerieux, Marcy L'Etoile, France).

Sintesi del composto M48U1, del Tenofovir e del gel HEC

Il peptide M48U1 (Van Herrewege et al., 2008) è stato sintetizzato dalla ditta Pepscan Presto Inc. (Lelystad, The Netherlands), attraverso una sintesi su fase solida: contiene un residuo di p-(cicloesilmetilossi) fenilalanina in posizione 23 e è stato purificato, dopo il *refolding*, tramite una cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a fase inversa (Martin et al., 2011).

Il Tenofovir, inibitore della trascrittasi inversa di HIV, è stato acquistato dalla ditta NIBSC (National Institute for Biological Standard and Control, Potters Bar, England).

Il gel HEC è stato preparato ad una concentrazione di 1,5% aggiungendo 1,5 g di polimero gelatinoso HEC (Natrosol 250 M Pharm, Aqualon, USA) a 100 g di buffer

citrato (5 mM, pH 4.5) e disciolto tramite un agitatore meccanico (Bouchemal et al., 2013). M48U1 e Tenofovir sono state disciolti in PBS con HEC allo 0.25%.

Infezione e trattamento antiretrovirale

I ceppi di laboratorio HIV-1 Bal e IIIb (5 ng/mL di p24) sono stati pre-incubati per 1 ora a 37°C con concentrazioni scalari di M48U1 (0 - 0,0033 - 0,033 - 0,33- 1 - 3,3 μ M) o di Tenofovir (0 - 0,5 - 1,25 - 2,5 - 5 - 10 μ M), disciolti in HEC 0,25% in un volume totale di 1 mL. Successivamente, alla miscela costituita da virus + composti, sono stati aggiunti i PBMCs attivati (1×10^6 cellule/mL) per 2 ore a 37°C. Terminata l'incubazione, quattro lavaggi con PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco) hanno consentito di eliminare l'eccesso di virus e le cellule sono state poi messe in piastra alla concentrazione di 5×10^5 cellule per pozzetto (duplicato), con terreno fresco contenente le medesime concentrazioni scalari dei due farmaci. Al giorno 4 e al giorno 7 post-infezione, sono stati raccolti i surnatanti cellulari per la quantificazione della proteina virale p24 (kit HIV-1 gag p24 antigen, Biomerieux, Marcy L'Etoile, France). I PBMCs non trattati sono stati utilizzati come controllo negativo dell'infezione. Gli esperimenti successivi con gli altri ceppi di laboratorio e gli isolati da paziente sono stati condotti utilizzando un'unica concentrazione di M48U1 (1 μ M) e di Tenofovir (5 μ M), sempre disciolti in HEC 0,25%, seguendo lo stesso schema sperimentale. La vitalità dei PBMCs è stata valutata tramite la conta cellulare con Trypan Blue, in presenza delle concentrazioni scalari di M48U1 e di Tenofovir in HEC 0,25%.

Analisi effetti dei farmaci su un modello di cellule cervico-vaginali

Le cellule cervico-vaginali utilizzate, EpiVaginal Tissue Model (VLC-100FT; MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) sono state acquistate alla MatTeK: il modello cellulare è costituito da uno strato di cellule epiteliali ectocervicali vaginali stratificate, contenenti sia le cellule di Langherans che una lamina propria ricca di fibroblasti, depositate su piccoli telai. Sulla superficie apicale di ciascun telaio sono stati aggiunti, in singolo, 50 μ l di M48U1 alla concentrazione di 6,7 μ M o di 0,67 μ M in HEC 0,25% più HIV-Bal 25 ng/mL e, sempre in singolo, 50 μ l di Tenofovir alla concentrazione di 2 μ M o 20 μ M in HEC 0,25% più HIV-Bal 25 ng/mL. Sullo stesso modello di cellule è stata testata, inoltre, la combinazione dei due farmaci a differenti concentrazioni,

sempre in presenza di virus Bal 25 ng/mL: i) 0,67 μ M di M48U1 con 2 μ M di Tenofovir in HEC 0,25%; ii) 6,7 μ M di M48U1 con 20 μ M di Tenofovir in HEC 0,25%. Dopo un'infezione di 24 ore, l'eccesso di virus è stato eliminato con due lavaggi in PBS e i telai contenenti la mucosa vaginale, sono stati messi in coltura in piastre da 24 pozzetti, addizionati con terreno appropriato (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA), in presenza delle stesse condizioni usate per l'infezione. Il terreno di coltura è stato cambiato ogni giorno con terreno fresco contenente le medesime condizioni di coltura e al giorno 4 è stata effettuata una raccolta del tessuto vaginale e del surnatante cellulare.

Il DNA virale totale è stata estratto dal tessuto utilizzando il kit QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguendo il protocollo indicato. La quantificazione del DNA provirale è stata effettuata attraverso una PCR Real Time quantitativa con il kit HIV DNA qPCR kit (Diatheva, Fano, Italy), basato sulla chimica del SYBR green . La mix di reazione (volume totale di 20 μ l) è così costituita: 10 μ l di DNA 2x master mix, 0,5 μ l di Hot-Rescue PLUS DNA polimerasi, 20 μ M di ciascun primer specifico per le regioni LTR del virus e 200 ng di DNA. I primer sono stati disegnati in modo da amplificare un frammento di 161 coppie di basi che copre la parte terminale del 5' LTR U5 (primer senso: 5'-TAGCAGTGGCGCCCGA-3') fino all'inizio della sequenza Gag-Pol (primer antisenso: 5'-TCTCTCTCCTTCTAGCCTCCGC-3').

La reazione di amplificazione è stata allestita secondo il seguente profilo termico: un ciclo iniziale di denaturazione a 95°C per 15 minuti, seguito da 10 cicli a 95°C per 15 secondi e ibridazione/estensione a 68°C per 35 secondi, e successivi 35 cicli con due step: denaturazione a 95°C per 15 secondi e ibridazione/estensione, con acquisizione di fluorescenza, a 68°C per 35 secondi. Alla fine della reazione, è stata effettuata l'analisi quantitativa dei campioni attraverso l'interpolazione con una curva standard (Bon et al., 2013).

Analisi potere citotossico e infiammatorio su cellule cervico-vaginali

Per valutare il potere citotossico e infiammatorio di M48U1 e Tenofovir in HEC 0.25%, sia in singolo che in combinazione, sul modello di cellule cervico-vaginali, abbiamo allestito un saggio MTT ET-50, seguito dalla quantificazione dei livelli di lattato deidrogenasi (LDH). In particolare abbiamo analizzato gli effetti indotti dalle massime

concentrazioni utilizzate dei farmaci in singolo (6,7 μ M di M48U1, 20 μ M di Tenofovir, sempre in HEC 0,25%) e dalla combinazione di queste dopo 1, 4, 18 ore dal trattamento. Il controllo negativo è rappresentato dalle cellule non trattate, mentre il controllo positivo è rappresentato dalle cellule trattata con Triton X-100 (1%).

Il valore di ET50 è stato determinato utilizzando il software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA), mentre i livelli di LDH sono stati quantificati con il kit LDH Cytotoxicity Detection kit (TaKaRa Bio Inc, Japan).

Analisi statistiche

Le diverse concentrazioni scalari di Tenofovir (0 – 0,1 – 0,5 – 1,25 – 2,5 – 5 – 10 μ M) e di M48U1 (0 – 0,001 – 0,005 – 0,03 – 0,15 – 0,75 – 1,5 μ M) sono state co-formulate e disciolte in HEC 0,25% e testate su colture cellulari di PBMCs attivate, infettate con HIV-1 Bal e IIIb (5 ng/mL di p24, secondo il protocollo descritto precedentemente). Al giorno 4 e al giorno 7 post-infezione, i surnatanti cellulari sono stati raccolti per la quantificazione della proteina virale p24. I dati ottenuti sono stati analizzati mediante un isobologramma, in accordo con i precedenti metodi riportati (Elion et al., 1954; Loregian et al., 2010; Luganini et al., 2011). Brevemente, l'EC50 viene utilizzata per calcolare la concentrazione frazionale inibitoria (FIC) come segue: FICx (EC50 del composto X utilizzato in combinazione/ EC50 del composto X utilizzato in singolo); FICy (EC50 del composto Y utilizzato in combinazione/ EC50 del composto Y utilizzato in singolo); FIC index è dato dalla somma tra FICx e FICy.

Se il valore di questo indice è uguale a 1, la combinazione dei due farmaci ha un effetto additivo; se è compreso tra 0,5 e 1, la combinazione ha un effetto parzialmente sinergico; quando è inferiore a 0,5, i due farmaci lavorano con un effetto pienamente sinergico; per valori compresi tra 1 e 2 la combinazione ha un effetto leggermente antagonistico; infine, per valori maggiori di 2, la combinazione è antagonista.

I dati ottenuti sull'utilizzo delle combinazioni dei due farmaci sono stati valutati anche attraverso il programma di analisi MacSinergy II (Prichard et al., 1990).

I risultati di tutti gli altri esperimenti sopra descritti sono espressi come media \pm deviazione standard (SD) di almeno tre esperimenti eseguiti in duplicato. Per la comparazione dei dati statistici è stato utilizzato il test two-tailed Student.

RISULTATI

Prima parte: HIV E COMPARTIMENTO OSSEO

Tat induce un aumento dei marker ossei analizzati

Il differenziamento dei monociti in senso osteoclastico è stato analizzato attraverso la determinazione dei livelli di espressione dei marker ossei, quali la Catepsina K (Cath K), il recettore per la Calcitonina (Cal R) e la Fosfatasi Acida Tartrato Resistente (TRAP).

La scelta della Catepsina K e del recettore per la Calcitonina è stata operata in base al fatto che questi marker non vengono espressi nei monociti, né come RNA messaggeri (mRNA), né in forma di proteine; negli osteoclasti, invece, i livelli di espressione di entrambi i marcatori sono facilmente rilevabili (Buckley et al., 2002). Anche TRAP viene considerato un marker di differenziamento e di attività biologica degli osteoclasti, in quanto è coinvolto nell'azione di riassorbimento osseo. Infatti, sebbene sia presente a bassi livelli nei monociti e nei macrofagi, viene iperespresso nei tumori ossei a cellule giganti e negli osteoclasti multinucleati (Minkin et al., 1982), con conseguente aumento della sua attività enzimatica.

Negli esperimenti che abbiamo condotto, l'analisi dei livelli di espressione di Cath K, Cal R e TRAP è stata eseguita a giorno 7, 10, 13 e 16 post-trattamento: nelle cellule trattate con la proteina Tat di HIV, si è osservato un aumento statisticamente significativo dei livelli di espressione di tutti e tre i marker analizzati rispetto al controllo negativo, rappresentato dalle colture cellulari trattate con M-CSF e RANKL. In particolare, nel caso della Catepsina K (FIG. 10), i livelli di espressione sono risultati superiori di 5 volte il controllo al giorno 13 e superiori di 6 volte al giorno 16; per il recettore della Calcitonina (FIG. 11), tale aumento si è registrato al giorno 10 (4 volte il controllo) e al giorno 13 (5 volte il controllo); nel caso di TRAP (FIG. 12), modifiche nei livelli di espressione si sono registrate già al giorno 10, con un picco di attivazione intorno al giorno 13 (superiore di 5,7 volte rispetto al controllo) e al giorno 16 (superiore di 5,9 volte rispetto al controllo).

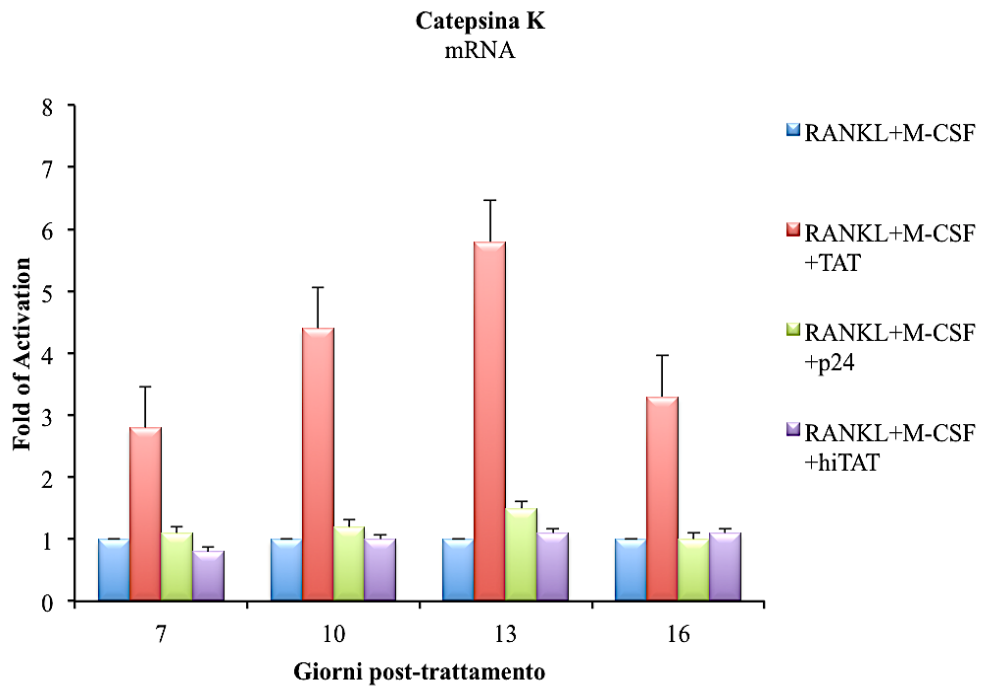


Figura 10: Livelli di espressione di Catepsina K

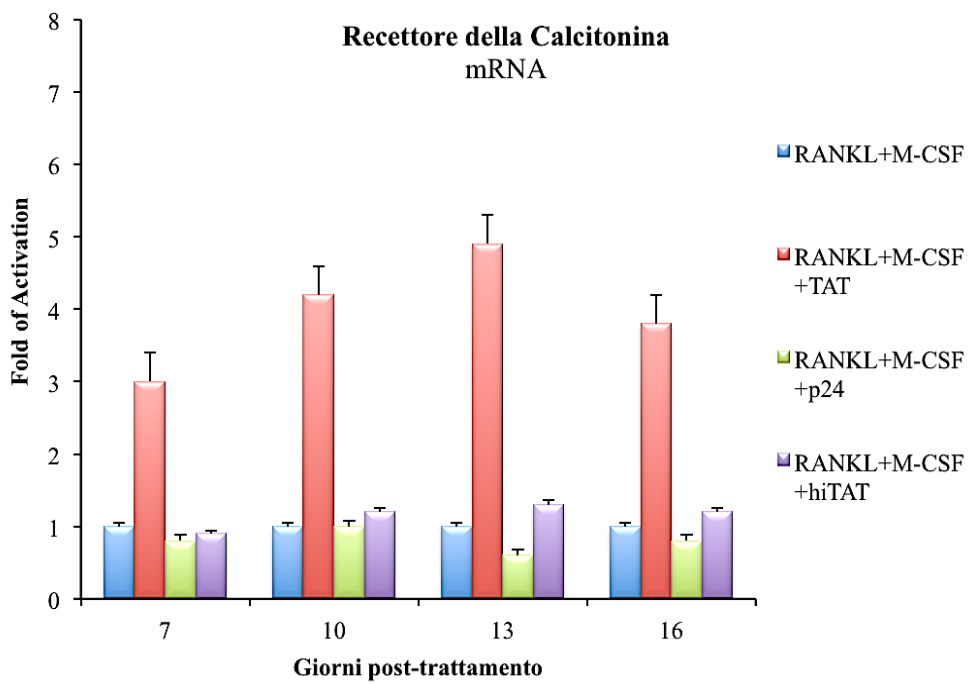


Figura 11: Livelli di espressione del recettore per la Calcitonina

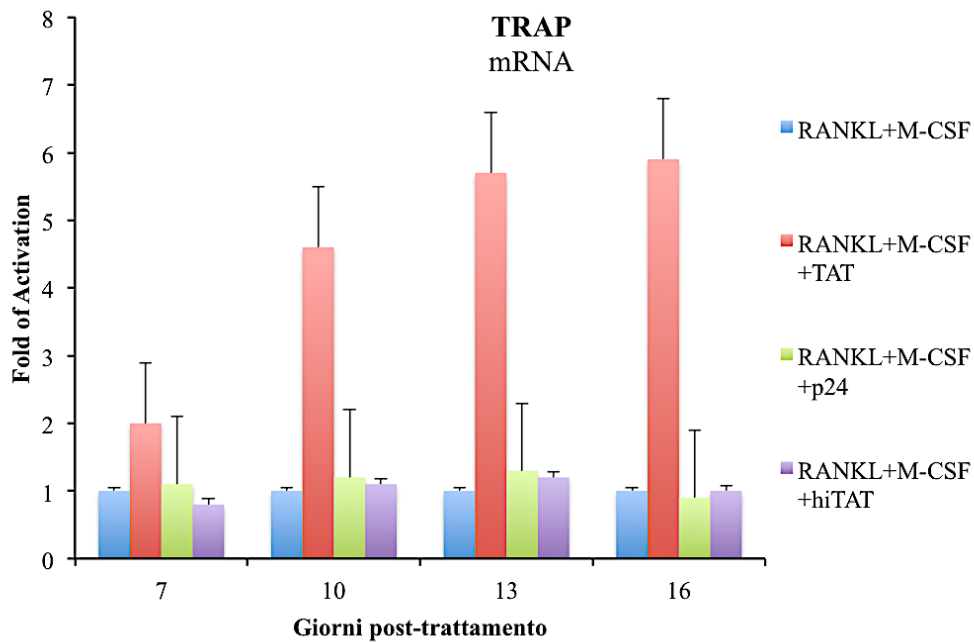


Figura 12: Livelli di espressione di TRAP

In aggiunta, l'effetto indotto dalla proteina virale Tat (effetto virus-indotto) si è dimostrato altamente specifico, considerando che nelle cellule trattate con la proteina p24 di HIV-1 o con TAT inattivata al calore non si è osservato alcun aumento dei livelli di espressione dei marcatori ossei rispetto al controllo. Abbiamo anche valutato se Tat potesse rappresentare un fattore di induzione “non canonico” del differenziamento, sostituendo RANKL e/o M-CSF: i risultati hanno indicato che il trattamento con Tat, da sola o in singola associazione con le citochine, non determina un aumento dei livelli di espressione dei marker analizzati (dati non mostrati), suggerendo quindi un effetto *enhancer*, piuttosto che *inducer*, nell'osteoclastogenesi.

La terapia antiretrovirale intensifica il differenziamento osteoclastico

Dopo avere stabilito che il virus HIV-1 ed, in particolare, la proteina Tat intensificano il differenziamento dei monociti in senso osteoclastico nei soggetti sani, abbiamo deciso di indagare l'effetto della terapia sul differenziamento nei soggetti HIV-sieropositivi.

A questo scopo, abbiamo analizzato i livelli di espressione dei marker ossei di monociti sani differenziati in senso osteoclastico in presenza di surnatanti cellulari ottenuti da linfociti T CD4+ di soggetti trattati o naive alla terapia antiretrovirale.

Come è possibile osservare dai nostri dati, la presenza di surnatanti cellulari dei soggetti in terapia, nel terreno di differenziamento, ha indotto un aumento significativo di tutti i marker ossei analizzati.

In particolare, si è osservato un aumento dei livelli di espressione dei marcatori citati solo nelle condizioni in cui il surnatante era presente insieme alle citochine RANKL e M-CSF, indicando quindi, anche in questo caso, un effetto *enhancer* piuttosto che *inducer*.

Infatti, nelle colture addizionate con i surnatanti dei soggetti trattati più le due citochine, si è osservato un aumento significativo dei livelli di espressione della Catepsina K al giorno 13 (3,9 volte il controllo) e al giorno 16 (4,3 volte rispetto al controllo) (FIG. 13); nel caso della Calcitonina, l'aumento è stato registrato al giorno 10 (3,6 volte il controllo) e al giorno 13 (4,2 volte rispetto al controllo) (FIG. 14).

Anche in questo set di esperimenti, TRAP (FIG. 15) ha mostrato un aumento di espressione anticipato al giorno 10, con un picco di attivazione al giorno 13 (4,9 volte il controllo) e al giorno 16 (5,3 volte rispetto al controllo).

Per contro, il trattamento dei monociti sani differenziati verso la linea osteoclastica con i surnatanti da soggetti naive non ha messo in evidenza alcuna variazione nei livelli di espressione dei marker analizzati e le quantificazioni ottenute sono risultate comparabili ai livelli di espressione indotti dalla presenza della sola proteina TAT nel terreno di differenziamento.

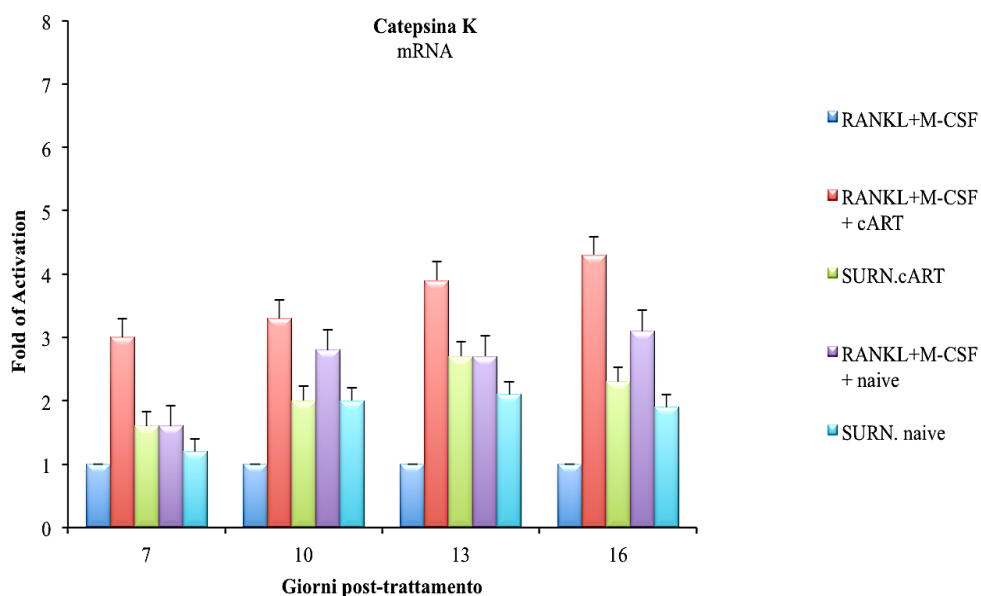


Figura 13: Livelli di espressione della Catepsina K

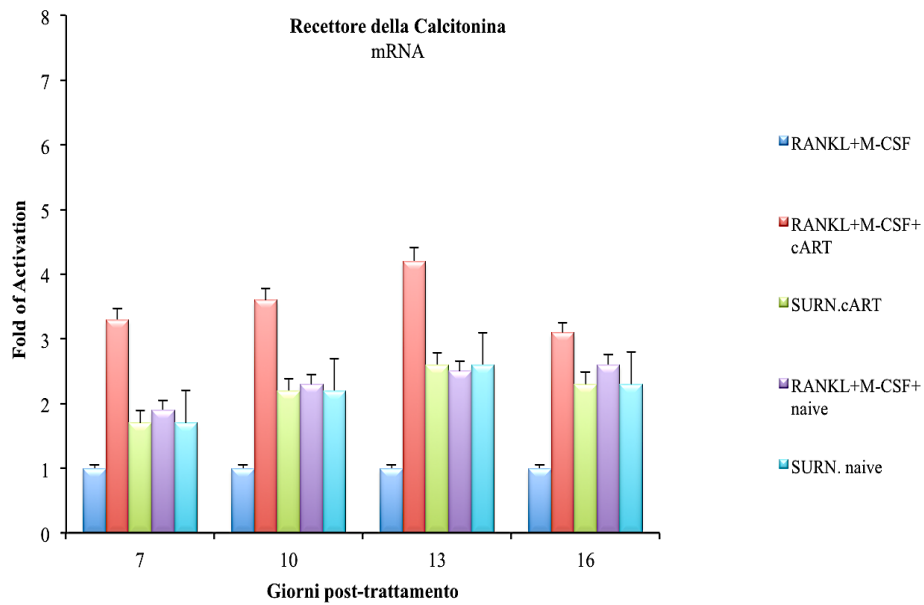


Figura 14: Livelli di espressione del recettore della Calcitonina

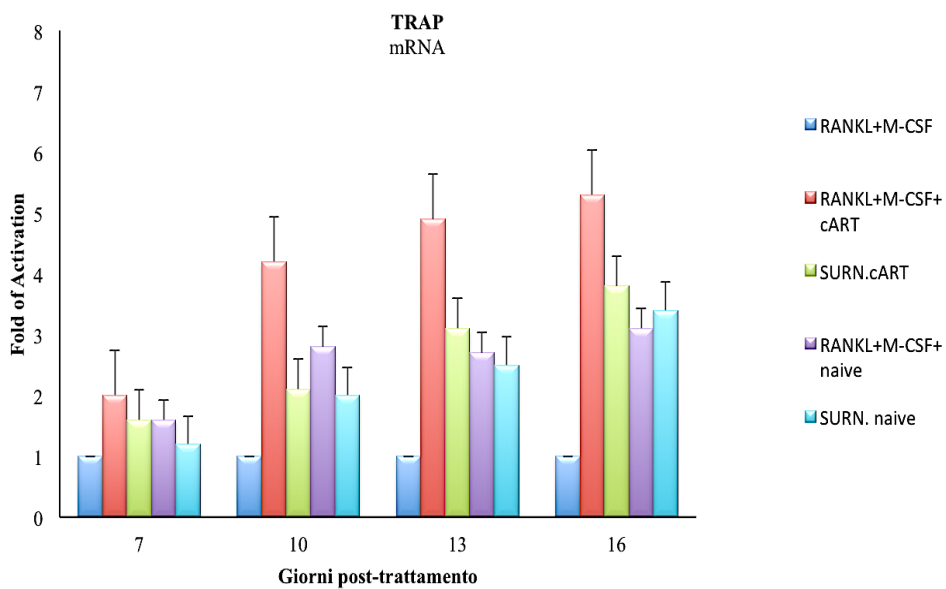


Figura 15: Livelli di espressione di TRAP

I livelli quantitativi di RANKL al baseline correlano con la variazione della BMD

Alla 48° e alla 96° settimana, i valori dei marker ossei analizzati rispetto al baseline non sono risultati associati con il cambiamento in percentuale dei valori della BMD, né a livello lombare né femorale; tuttavia, i valori di RANKL al basale sono risultati positivamente correlati con una minore perdita in percentuale della BMD. Infatti, livelli di RANKL < 32 pg/mL al baseline hanno mostrato un aumento in percentuale dei valori di BMD: risultato particolarmente evidente e significativo nel braccio 1, ossia nei soggetti che avevano effettuato lo switch alla monoterapia, soprattutto a livello lombare (FIG. 16); invece, nei soggetti candidati a continuare la terapia in atto (braccio 2), un aumento del BMD della zona femorale (FIG. 16) è stato visto nelle fasi intermedie.

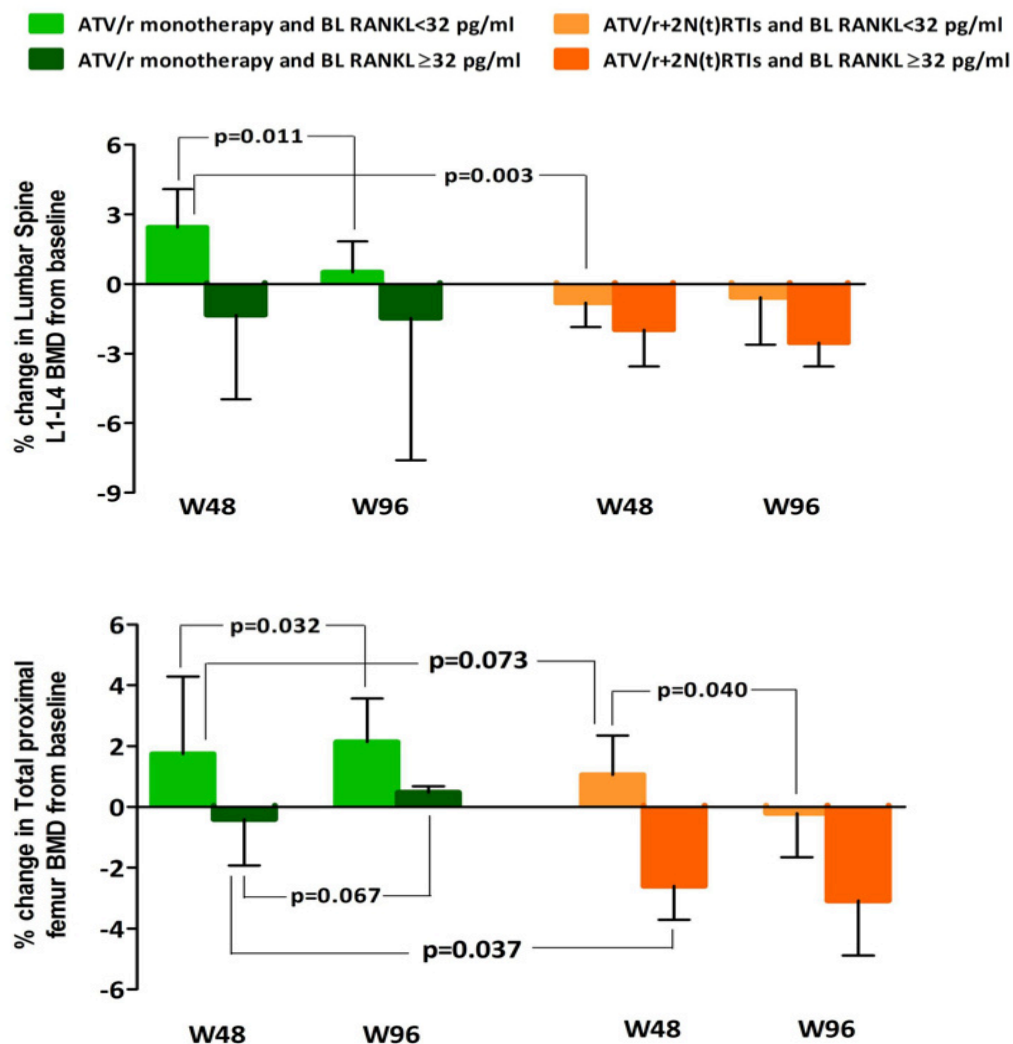


Figura 16: Variazioni in percentuale della BMD nella zona lombare (L1-L4) e a livello del femore totale prossimale

M48U1 e Tenofovir inibiscono l'infezione di ceppi di HIV-1 X4 e R5 tropici nei PBMCs

Al fine di stabilire l'efficacia antivirale di un nuovo composto anti-HIV da utilizzare come microbicide per uso topico a livello vaginale, nel primo set di esperimenti il nostro composto (M48U1) e il Tenofovir (NRTI) sono stati testati su PBMCs attivati per stabilire la concentrazione ottimale da utilizzare dei due farmaci. 5 ng/mL di p24 di HIV-1 Bal (virus R5 tropico) e di HIV-1 IIIb (virus X4 tropico) sono stati pre-incubati per 1 ora a 37°C in terreno RPMI1640 con concentrazioni scalari (0 - 0,0033 - 0,033 - 0,33 - 1 - 3,3 μ M) di M48U1 in HEC 0,25%,; a questa miscela sono stati aggiunti i PBMCs attivati per 2 ore a 37°C. Per valutare l'effetto di inibizione dell'infezione, abbiamo effettuato la quantificazione della proteina virale p24 Gag nei surnatanti di coltura attraverso un saggio ELISA, al giorno 7 post-infezione. I dati ottenuti hanno indicato un importante decremento della quantità di p24 nelle nostre condizioni sperimentali (FIG. 17): infatti, il valore di EC50 di M48U1 è risultato essere pari a 30 nM (95% CI 15.3-55.7) nelle colture infettate con il ceppo HIV-1 Bal, e a 20.3 nM (95% CI 9.3-40.3) in quelle infettate con HIV-1 IIIb.

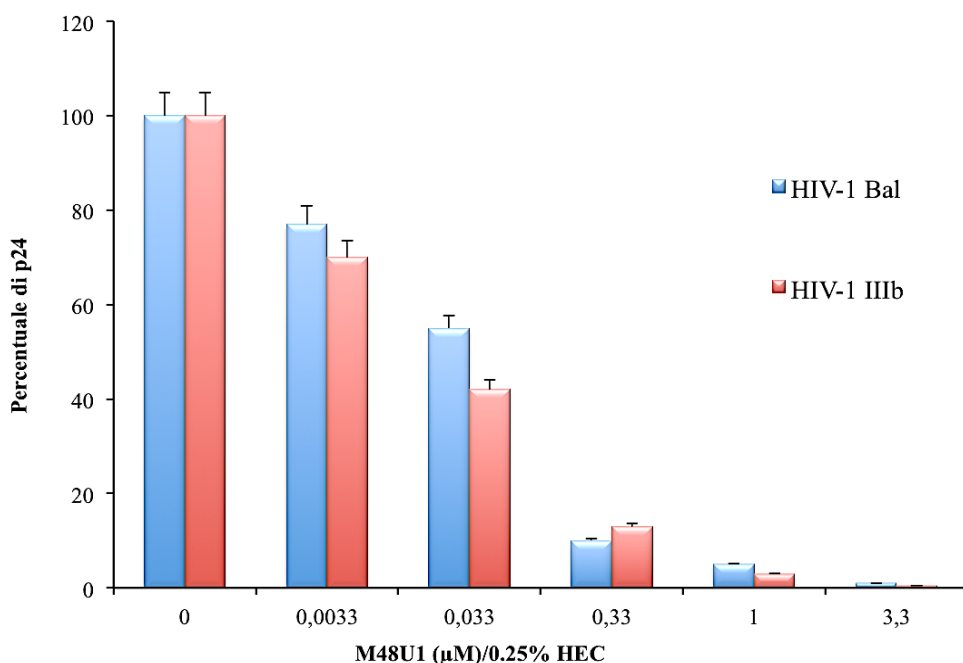


Figura 17: Percentuale di p24 in surnatanti di cellule trattate con concentrazioni scalari di M48U1+HEC 0,25%

In parallelo, è stato testato l'effetto inibitorio del Tenofovir in presenza di HEC 0,25% (nonostante il farmaco abbia un noto potere antivirale): concentrazioni scalari (0,1 – 0,5 – 1,25 – 2,5 – 5 – 10 μM) di Tenofovir in HEC 0,25% sono state aggiunte alle colture di PMBCs attivati, infettati con i ceppi di HIV-1 Bal e IIIb.

Anche in questo caso i livelli quantitativi della proteina p24 Gag, al giorno 7 post-infezione, sono risultati fortemente ridotti: in particolare, il valore di EC50 per il Tenofovir è risultato essere pari a 1,1 μM (95% CI 0,79-1,4) nell'infezione con il ceppo Bal di HIV-1 e a 0,69 μM nell'infezione con il ceppo IIIb (FIG. 18).

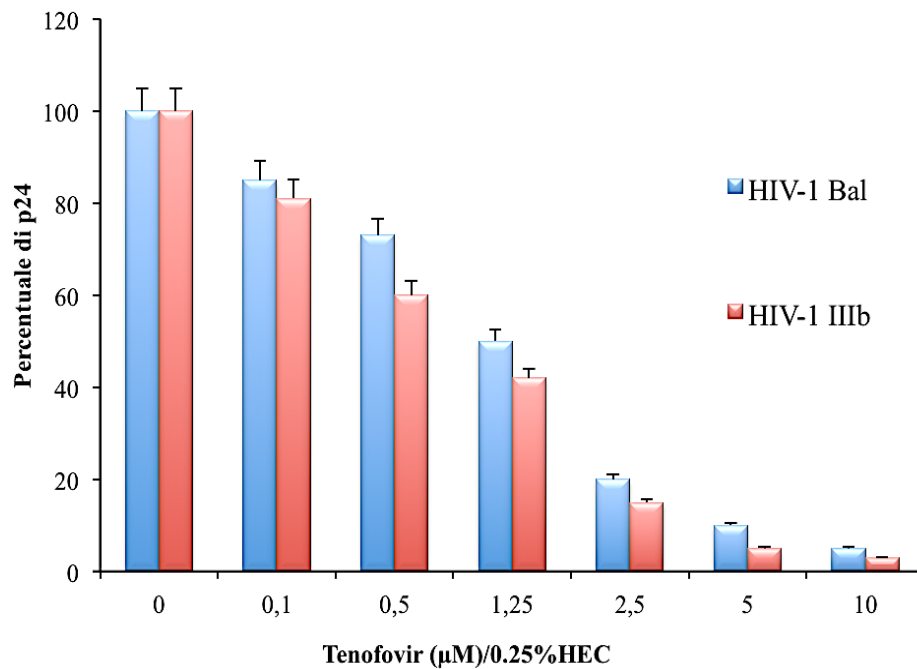
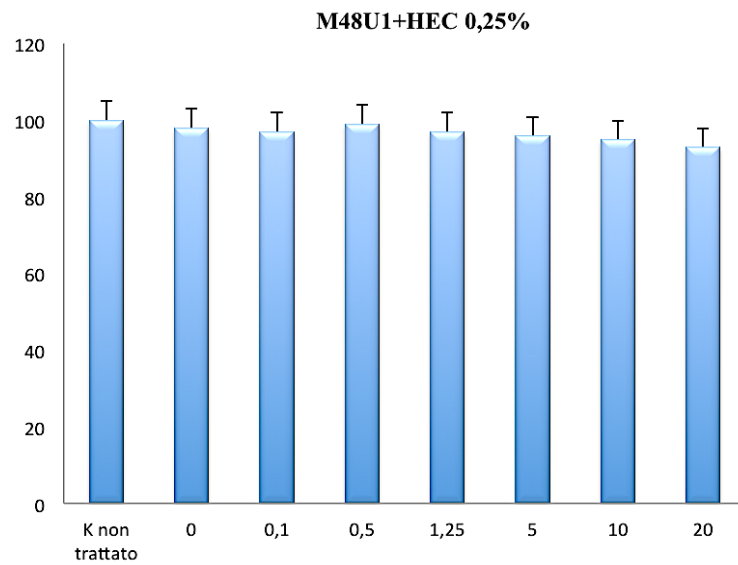
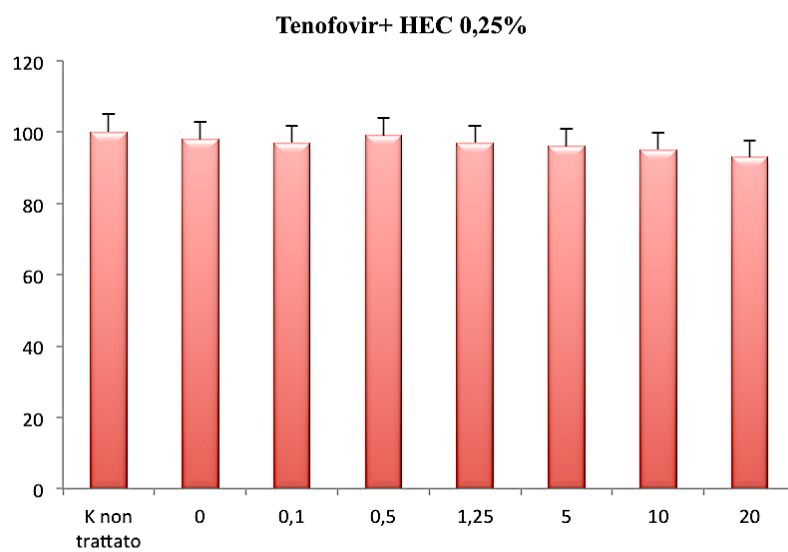


Figura 18: Percentuale di p24 in surnatanti di cellule trattate con concentrazioni scalari di Tenofovir

Infine, per escludere la possibilità che l'effetto inibitorio fosse dovuto a un'azione citotossica a livello dei PBMCs, abbiamo valutato la vitalità delle cellule trattate con le diverse concentrazioni scalari sia di M48U1/HEC 0,25% che di Tenofovir/HEC 0,25% mediante la colorazione con Trypan blue: i valori di CC50 erano maggiori di 10 μM nel caso di M48U1 e maggiori di 20 μM nel caso del Tenofovir (FIG. 19). Di conseguenza, nessuna citotossicità è risultata ascrivibile ai due farmaci co-formulati con HEC 0,25%.



M48U1 (μ M)/0.25%HEC



Tenofovir (μ M)/0.25%HEC

Figura 19: Percentuale della vitalità di PBMCs trattati con concentrazioni scalari di M48U1 /Tenofovir in HEC 0,25%

M48U1 e Tenofovir inibiscono l'infezione di ceppi di riferimento di HIV-1 e di isolati da pazienti

Stabilita la concentrazione ottimale, abbiamo saggiato l'effetto inibitorio di M48U1/HEC 0,25% alla concentrazione di 1 μ M e di Tenofovir/HEC 0,25% 5 μ M in PBMCs attivati, infettati con diversi ceppi di riferimento di HIV-1 e alcuni ceppi isolati da pazienti. Oltre ai ceppi HIV-1 Bal e HIV-1 IIIb, sono stati utilizzati altri quattro ceppi di laboratorio, HIV-1 Ada e HIV-1 RU132 (R5 tropici), HIV-1 ARV-2 (R5/X4 tropico) e HIV-1 CBL4 (X4 tropico). La riduzione della p24, al giorno 7 post-infezione, è risultata statisticamente significativa ($p < 0.05$) (FIG. 20).

Sono stati anche saggiati ceppi virali di sottotipo B isolati da tre soggetti sieropositivi, due in fallimento terapeutico e uno naive alla terapia. Il sequenziamento del loop V3 del virus isolato da questi pazienti aveva messo in luce che il soggetto naive aveva un'infezione sostenuta da un ceppo R5 tropico (HIV-1 AMBR5N), mentre i due soggetti in fallimento terapeutico albergavano rispettivamente un virus con tropismo dual-tropico (HIV-1 ARR5X4) ed un virus con tropismo X4 (HIV-1 CSBX4). In tutti e tre i casi, la concentrazione di 1 μ M di M48U1/HEC 0,25% si è dimostrata in grado di prevenire la trasmissione dell'infezione nei PBMCs attivati (FIG. 20). Il trattamento con 5 μ M di Tenofovir/HEC 0,25%, invece, è risultato essere efficace solo nel contrastare il ceppo isolato dal soggetto naive, e non nei ceppi isolati dai pazienti trattati, a causa della presenza di mutazioni di resistenza a carico degli inibitori della trascrittasi inversa.

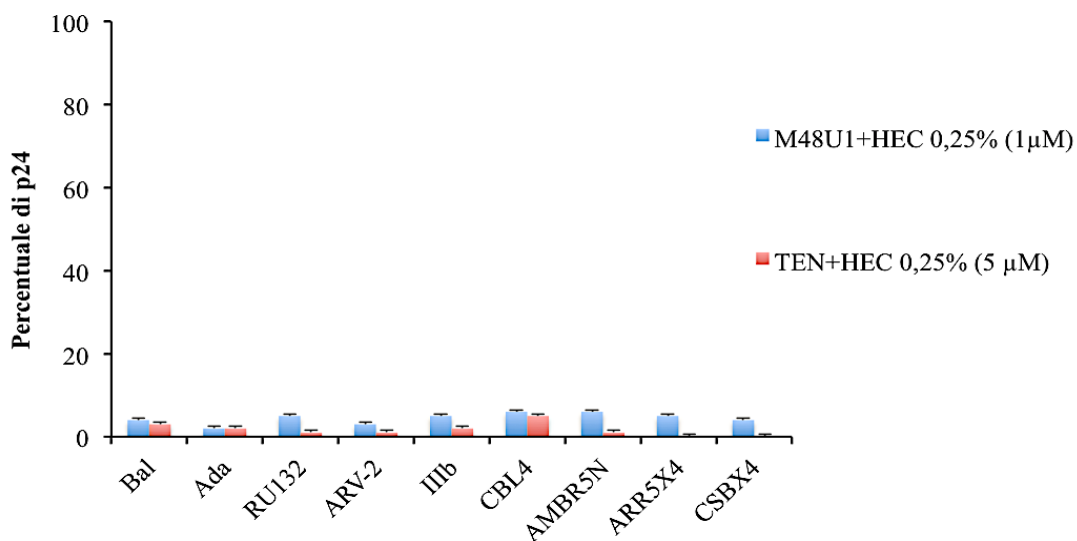


Figura 20: Percentuale di p24 in surnatanti di cellule infettate con diversi ceppi di laboratorio e isolati da pazienti, trattate con M48U1/TEN+HEC 0,25%

Effetto sinergico di M48U1 e Tenofovir in HEC 0,25% sull'inibizione di HIV-1

Dal momento che diversi studi hanno dimostrato che il Tenofovir è in grado di instaurare rapporti di sinergia con numerosi farmaci antiretrovirali, tra cui gli NRTI, PI e inibitori dell'*entry* virale, si è deciso di valutare la possibilità di un effetto sinergico anche con il composto miniCD4, M48U1. Le diverse concentrazioni scalari dei due farmaci in HEC 0,25% sono state incrociate per saggiare l'effetto inibitorio sui PBMCs attivati infettati con HIV-1 Bal. Al giorno 7 post-trattamento, è stata evidenziata una potente riduzione della percentuale di p24, correlata con le concentrazioni dei due farmaci utilizzati (FIG. 21).

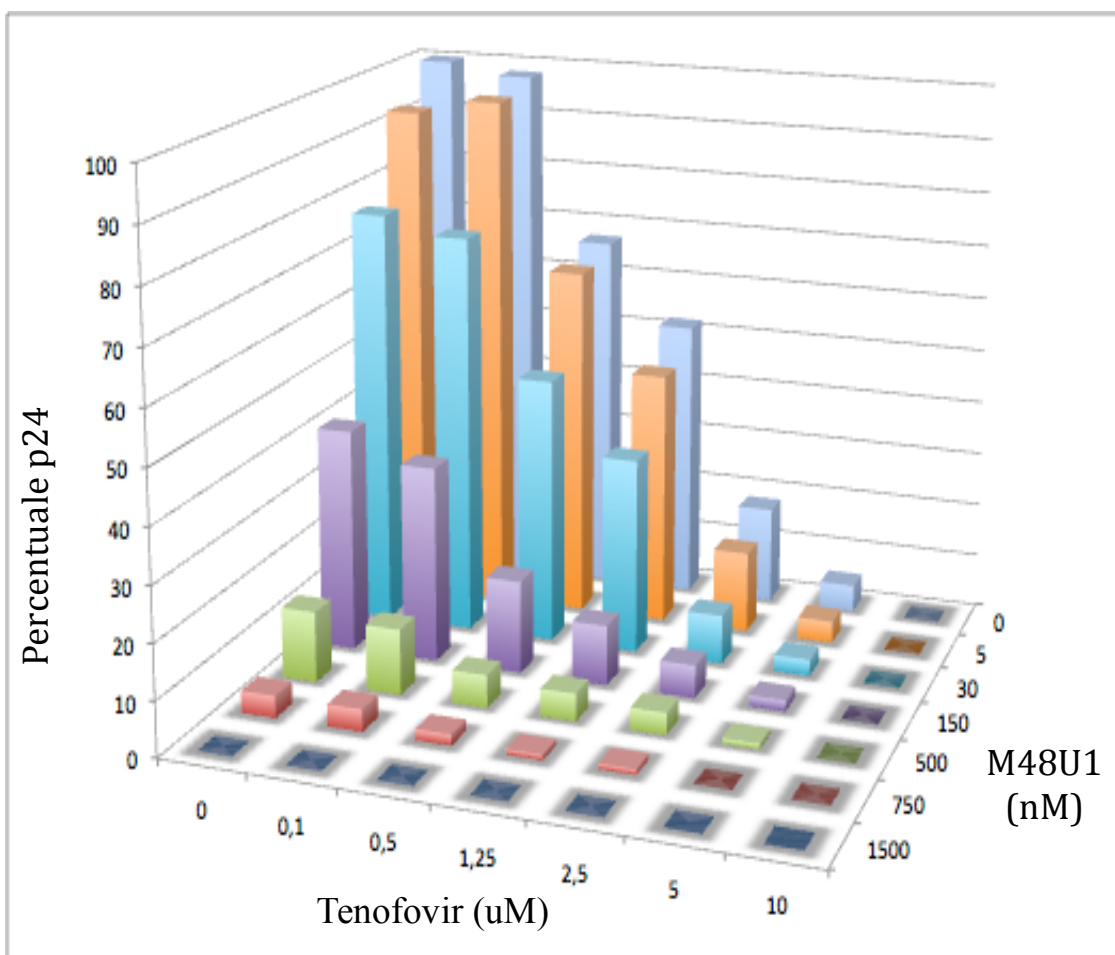


Figura 21: Percentuale p24 in surnatanti di PBMCs trattati con diverse combinazioni di Tenofovir e M48U1 in HEC 0,25%, a concentrazioni scalari

La potenziale azione sinergica dei due farmaci è stata stimata mediante un'isobologramma (FIG. 22): il valore di FIC relativo al trattamento con la combinazione Tenofovir/M48U1/HEC 0,25% è risultato inferiore a 0.5, testimoniando un effetto sinergico tra i due farmaci, che agiscono in fasi diverse del ciclo replicativo virale. La vitalità cellulare mediante tecnica Trypan blue ha confermato che nessuna tossicità era ascrivibile all'utilizzo dei due farmaci in combinazione (dati non mostrati).

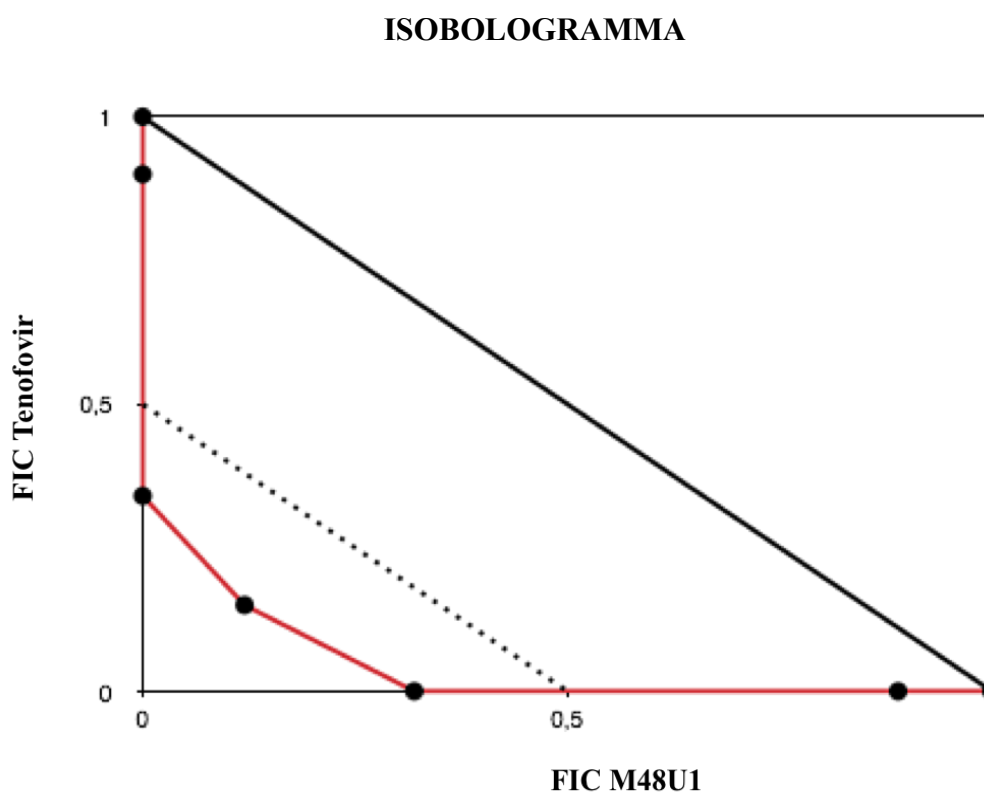


Figura 22: Isobologramma che rappresenta la FIC della combinazione dei due farmaci

M48U1 e Tenofovir inibiscono la replicazione di HIV-1 in cellule cervico-vaginali

Dopo aver dimostrato che Tenofovir e M48U1 lavorano in modo sinergico sui PBMCs, abbiamo voluto verificare la persistenza di questo effetto antiretrovirale anche su un modello *ex vivo* di cellule epiteliali cervico-vaginali. M48U1 e Tenofovir, formulati in gel HEC 0,25%, sono stati utilizzati in singolo o in combinazione al fine di valutarne

l'efficacia come potenziale microbicida ad uso topico sulle mucose vaginali. Sulla superficie apicale di queste cellule sono state aggiunte due diverse concentrazioni di M48U1 (0,67 e 6,7 μM), due di Tenofovir (2 e 20 μM) e le combinazioni incrociate delle due concentrazioni (M48U1 0,67 μM + Tenofovir 2 μM e M48U1 6,7 μM + Tenofovir 20 μM), sempre in HEC 0,25%; l'infezione è stata sostenuta con un ceppo HIV-1 Bal (concentrazione 25 ng/mL). In particolare, la scelta di HIV-1 Bal, virus R5-tropico, è giustificata dal fatto che la trasmissione sessuale è quasi esclusivamente supportata da virus con questo tropismo. La quantificazione in Real Time del DNA provirale estratto dalle cellule cervico-vaginali, a 4 giorni post-infezione, ha mostrato un decremento dei livelli di DNA provirale di 12 e 51 cicli rispettivamente, alla concentrazione di 6,7 μM di M48U1 e di 20 μM di Tenofovir, rispetto al controllo positivo non trattato.

A concentrazioni minori di M48U1 e Tenofovir, la riduzione si è mantenuta stabile, anche se meno marcata (8 e 12 cicli rispettivamente). Alle concentrazioni più alte dei due farmaci, il DNA provirale è risultato non rilevabile, mentre alle concentrazioni più basse dei due farmaci si è osservato un livello di decremento della quantità di DNA provirale di circa 30 cicli. Il potenziale effetto citotossico e infiammatorio sulle cellule cervico-vaginali trattate con le concentrazioni maggiori dei due farmaci (20 μM per M48U1 e 20 μM per Tenofovir in HEC 0.25%), sia in singolo che in combinazione, è stato valutato con un saggio MTT e tramite la quantificazione di LDH. I risultati ottenuti hanno mostrato livelli di attività metabolica e vitalità assolutamente paragonabili al controllo negativo non trattato, indicando quindi una totale assenza di potenziali effetti tossici.

DISCUSSIONE

Sono trascorsi ormai 34 anni dalla descrizione dei primi casi di AIDS e ci troviamo in una nuova era della gestione clinico-terapeutica della malattia da HIV. Le nuove e potenti terapie antiretrovirali di combinazione (cART) hanno drasticamente ridotto la mortalità per AIDS e prolungato notevolmente l'attesa media di vita delle persone sieropositive, che è divenuta analoga a quella delle persone sieronegative. Dall'altro lato, però, il danno d'organo causato dall'infezione da HIV e le conseguenze a lungo termine della terapia antiretrovirale non sono ancora del tutto noti, parallelamente all'osservazione di un aumento dell'incidenza di malattie cardiovascolari, renali ed ossee in questa popolazione di individui. Quale sia l'esatto contributo dato, all'insorgenza di queste comorbidità, da parte della replicazione virale residua, dei farmaci antiretrovirali, dello stato di infiammazione e di immunoattivazione cronica, non è ancora noto.

Il problema del trattamento del paziente con infezione da HIV implica dunque non solo la corretta gestione della terapia antiretrovirale, ma anche una valutazione multidisciplinare delle sue comorbidità nell'ottica di una vera e propria "*care*" della persona sieropositiva.

Il processo di cura non può poi essere disgiunto da una strategia efficace di prevenzione attraverso i comportamenti e i presidi farmacologici, alla luce delle recenti evidenze scientifiche.

Una crescente attenzione è rivolta non solo allo sviluppo di molecole antivirali con minori effetti collaterali, ma anche al corretto utilizzo dei farmaci a disposizione e all'aderenza dei pazienti alla terapia. Lesioni a carico del sistema cardiovascolare, renale, nervoso e del compartimento osseo sono le principali lesioni indotte dall'infezione da HIV e dalla terapia antiretrovirale.

Di particolare rilievo sono le lesioni a carico del compartimento osseo, poiché i soggetti sieropositivi mostrano un rischio di sviluppare osteoporosi 3,7 volte maggiore rispetto alla popolazione sana (Brown et al., 2006).

Lo sviluppo della patologia, inizialmente, era stato attribuito unicamente alla terapia assunta, in particolare ai regimi contenenti gli inibitori delle proteasi o al Tenofovir (inibitore nucleosidico della Trascrittasi Inversa); successivamente, si è scoperto che

anche il virus, con le sue proteine, interrompe il *cross-talk*, nella *Bone Forming Unit*, tra osteoclasti e osteoblasti.

Nei soggetti sieropositivi, l'interruzione di questo equilibrio comporta lo sviluppo di condizioni di ipovitaminosi D, che possono sfociare in fenomeni di osteopenia e osteoporosi, nelle fasi più avanzate dell'infezione.

Numerosi studi hanno dimostrato che, nei soggetti HIV positivi, si osserva una *down-regulation* a carico delle cellule della linea osteoblastica, attraverso diversi meccanismi di azione. Infatti, in questi soggetti, si osserva una diminuzione del numero di cellule osteoblastiche funzionalmente attive, dovuto sia all'induzione di apoptosi, mediata dal $TNF\alpha$, che all'inibizione della proteina Runx-2, indotta dalla gp120 virale, che sposta il differenziamento di cellule staminali mesenchimali verso la linea adipogenica, riducendo il differenziamento in senso osteoblastico (Gibellini et al., 2008).

Nei soggetti trattati con cART (*combined AntiRetroviral Therapy*), si osserva una maggiore tendenza allo sviluppo di osteopenia e osteoporosi, a causa degli effetti collaterali dei farmaci antiretrovirali. Infatti, si possono osservare fenomeni di acidosi acuta, con conseguente aumento di riassorbimento osseo, nei regimi con farmaci NRTI (Carr et al., 2011) oppure riduzione dei livelli di vitamina D (ipovitaminosi D), dovuti alla riduzione del GFR (*Glomerular Filtration Rate*) nel caso di regimi contenenti Tenofovir (Reynes et al., 2013) o attivazione del citocromo P450, nel caso di assunzione di farmaci inibitori della proteasi (PI) (Vescini et al., 2011). Inoltre, sempre su un modello di cellule *osteoblast-like*, sono emersi dati interessanti sul rapporto tra i livelli delle citochine RANKL/OPG, in presenza di particolari farmaci appartenenti alla classe dei PI (Gibellini et al., 2010): l'equilibrio della BFU sembra essere compromesso dall'alterazione dei livelli di queste due citochine, dalla cui interazione dipende la regolazione del riassorbimento osseo.

In particolare, RANKL è una proteina prodotta dagli osteoblasti e rappresenta il ligando del recettore RANK, espresso sulla superficie delle cellule osteoclastiche. Il legame tra RANKL e RANK porta alla trasduzione di un segnale diretto a NF-kB (fattore nucleare di trascrizione che regola la produzione di molte citochine pro-infiammatorie) che, a sua volta, induce il differenziamento, lo sviluppo e l'attivazione degli osteoclasti. L'attività biologica di RANKL è regolata negativamente da un'altra proteina prodotta dagli osteoblasti, l'osteoprotegerina (OPG), che agendo da recettore "esca", si lega a RANKL e impedisce il legame di quest'ultimo su RANK, inibendo l'osteoclastogenesi. Dal momento che nell'omeostasi ossea sono coinvolte anche le cellule della linea

osteoclastica, responsabili del riassorbimento osseo, ci siamo chiesti se, anche in queste cellule, il virus e/o la terapia avessero un qualche effetto tale da giustificare, insieme ai dati presenti sugli osteoblasti, la variazione della densità di massa ossea (BMD) nei soggetti sieropositivi.

Per valutare un effetto diretto del virus e delle sue proteine sul differenziamento in senso osteoclastico, abbiamo analizzato il livelli di espressione di alcuni marker ossei in monociti indotti in differenziamento tramite le citochine RANKL e M-CSF, in presenza/assenza della proteina virale Tat. Dai dati ottenuti si evince che Tat intensifica il differenziamento osteoclastico, poiché si osserva un aumento dei livelli di espressione dei marker ossei, tra cui il recettore per la Calcitonina, la Catepsina K e la Fosfatasi Acida Tartrato Resistente (TRAP). Tale differenziamento, però, si realizza solo in presenza di RANKL e M-CSF nel terreno di differenziamento, poiché in colture trattate esclusivamente con Tat e/o una delle due citochine, non si osserva un aumento dei livelli di espressione dei suddetti marker.

Sappiamo inoltre, dai dati presenti in letteratura, che nei soggetti trattati si osserva una maggiore frequenza di linfociti T attivati a livello periferico, rispetto ai soggetti naive alla terapia (Gazzola et al., 2013): questa condizione è correlata alla riduzione della BMD.

Infatti, i linfociti T attivati rilasciano RANKL e altre citochine pro-infiammatorie (IL-1 e TNF- α), che promuovono l'attività osteoclastica (Muller et al., 2002).

Partendo da queste osservazioni, abbiamo testato i surnatanti cellulari di linfociti T isolati da soggetti sieropositivi nell'induzione del differenziamento osteoclastico. Le cellule sono state attivate con la fitoemagglutinina, poiché questo protocollo di attivazione, induce l'osteoclastogenesi (Wyzga et al., 2004).

Abbiamo selezionato due categorie di pazienti: i soggetti trattati con cART e i soggetti naive alla terapia. I risultati ottenuti indicano un aumento dei livelli di espressione dei marker ossei nei monociti trattati con RANKL+M-CSF in combinazione con i surnatanti di cellule da soggetti trattati. I livelli di espressione degli stessi marker, invece, sono paragonabili al controllo in colture di monociti trattate con RANKL+M-CSF in combinazione con i surnatanti di cellule da soggetti naive. I risultati sono in linea con quanto dimostrato nel lavoro precedentemente citato (Gazzola et al., 2013) perché, nelle colture trattate con i surnatanti ottenuti da soggetti in terapia, si osserva un

intensificazione del differenziamento in senso osteoclastico, causato dalle citochine rilasciate dai linfociti T attivati dei soggetti in trattamento (Muller et al., 2002 Marchetti et al. 2006).

In conclusione, sia la terapia che il virus interferiscono sull'equilibrio osteoblasto-osteoclasto, favorendo l'attività di osteolisi a discapito dell'attività di osteosintesi, con conseguente riduzione dei livelli di BMD.

Il ruolo centrale giocato dai livelli di RANKL nella regolazione dell'omeostasi ossea è stato dimostrato anche nel sottostudio OsteoMODAT (Spagnuolo et al., 2015), in cui venivano valutati numerosi parametri (funzionalità renale, recupero immunologico, fallimento terapeutico, alterazioni lipidiche o glucidiche e variazioni di BMD), in seguito alla semplificazione, in un braccio dello studio, della classica triplice terapia ad una monoterapia basata sui PI.

I dati relativi al compartimento osseo ottenuti dallo studio OsteoMODAT hanno mostrato che non ci sono significative differenze, nei due bracci dello studio, nei livelli quantitativi dei marker ossei analizzati, tranne nel caso della citochina RANKL.

Infatti, solo i soggetti che all'inizio del trattamento mostravano bassi livelli della proteina RANKL (<32 pg/mL), esibivano, a 48 e a 96 settimane, un recupero della densità minerale di massa ossea. Questo effetto era particolarmente evidente nei soggetti in monoterapia a livello della zona lombare, mentre a livello femorale in entrambe le popolazioni si osservava, nelle fasi intermedie, un aumento dei valori della BMD.

Nonostante i numerosi progressi nella ricerca in campo farmacologico per la messa a punto di nuovi farmaci sempre più tollerati e dotati di maggiore efficacia terapeutica, ad oggi, la terapia antivirale non rappresenta una strategia risolutiva, a causa dei persistenti *reservoirs* nell'organismo ospite, dove il virus si integra stabilmente, al riparo dall'azione dei farmaci.

Proprio per questo motivo, la comunità scientifica sta focalizzando sempre più la propria attenzione su strategie terapeutiche innovative, con lo scopo di prevenire la trasmissione dell'infezione, che avviene nella maggior parte dei casi per via sessuale (UNAIDS/WHO, 2013).

Le donne rappresentano più della metà dei soggetti sieropositivi, con il 58% dei casi nell'Africa Sub-Sahariana (UNAIDS/WHO, 2013a), dove l'AIDS è considerata la principale causa di morte di donne in età fertile (UNAIDS/WHO (2013b).

Le strategie preventive finora testate, come ad esempio l'allestimento di diversi vaccini, si sono rivelate inefficaci nel contrastare la trasmissione dell'infezione a causa dell'alta variabilità genetica del virus e alle sofisticate interazioni che si instaurano tra HIV e il sistema immunitario umano (Cohen et al., 2013).

Una promettente strategia di prevenzione è rappresentata dall'utilizzo dei microbicidi, ovvero di molecole con proprietà antiretrovirali, veicolati in un gel, da applicare a livello delle mucose vaginali prima di un rapporto sessuale non protetto (Morris et al., 2010; Lederman et al., 2006).

A tal riguardo, i primi dati incoraggianti sono stati ottenuti dal trial CAPRISA 004, in cui si osservava l'efficacia di un gel formulato con Tenofovir all'1%, nel ridurre (del 39%) la trasmissione dell'infezione da HIV-1 (Abdool et al., 2010).

Un importante ruolo nella prevenzione dell'infezione da HIV-1 potrebbe anche essere svolto dai peptidi CD4 mimetici, che agiscono interferendo con il legame tra il recettore CD4 e la gp120 virale. Queste proteine, infatti, mimando il recettore presente sulle cellule target, sequestrano la gp120 prevenendo l'adesione del virus sulla superficie cellulare. Numerosi studi (Lin et al., 2003; Vermeire et al., 2004; Sepúlveda-Crespo et al., 2015; Bon et al., 2013; Srivastava et al., 2008; Dereuddre-Bosquet et al., 2012) dimostrano una forte riduzione della trasmissione dell'infezione, in donne trattate con gel vaginali contenenti peptidi CD4 mimetici, tanto da ipotizzare un possibile utilizzo di queste molecole come microbicidi.

Inoltre, la combinazione di diverse strategie preventive consentirebbe non solo l'utilizzo contemporaneamente di molecole che agiscono su diverse fasi del ciclo replicativo del virus, ma anche l'assunzione dei farmaci a dosi inferiori, riducendo potenziali danni a livello vaginale ed innalzando la barriera genetica degli stessi.

Sulla base di questi dati, quindi, abbiamo deciso di analizzare l'efficacia di un peptide mimetico miniCD4, chiamato M48U1, nel ridurre l'infezione da HIV-1 su PBMC da donatori sani e su un modello di cellule cervico-vaginali umane.

M48U1, grazie alla presenza di un residuo di fenilalanina modificato in posizione 23, si inserisce stabilmente all'interno della cavità della gp120, con un'affinità di legame maggiore rispetto alla CD4 cellulare (Van Herrewege et al., 2008; Acharya et al., 2013). M48U1 e Tenofovir, veicolati in gel HEC, sono stati testati a diverse concentrazioni; la scelta del gel HEC (*HydroxyEthylCellulose*) allo 0,25% è giustificata dall'assenza di potere tossico e infiammatorio sui modelli cellulari (Bouchemal et al., 2015). Inoltre, il gel non sembra interferire con la diffusione attraverso le mucose delle due molecole,

risulta stabile al pH vaginale e resistente all'azione delle proteasi specifiche (Bouchemal et al., 2015).

I risultati ottenuti mostrano come già a concentrazioni intermedie di entrambi i farmaci, in singolo, si osservano importanti riduzioni dei livelli di p24 virale. Tale riduzione è ancora più evidente nel caso di trattamento con la combinazione M48U1 e Tenofovir perché, in questa condizione, possiamo osservare riduzioni ancora maggiori dei livelli di p24 virale a concentrazioni di farmaco molto più basse rispetto alla dose necessaria nel caso del trattamento in singolo. Gli effetti ottenuti sono stati osservati sia *in vitro*, su cellule PBMC da donatori sani, infettate con diversi ceppi di HIV-1 e con ceppi isolati da pazienti, indipendentemente dal sottotipo o tropismo virale, sia *ex vivo*, su un modello di cellule cervico-vaginali umane.

I dati ottenuti dal trial CAPRISA 004 hanno dimostrato che il Tenofovir in gel all'1% risulta essere efficace anche nel ridurre l'infezione di HSV-2, che seppure indirettamente, aumenta il rischio di trasmissione di HIV-1 a causa della comparsa di ulcere genitali. Tutti questi dati dimostrano, quindi, come la combinazione di M48U1 e Tenofovir in HEC 0,25%, possa rappresentare un candidato ideale come microbicida, perché possiede un elevato potere antiretrovirale (anche su altri virus a trasmissione sessuale) e non risulta avere effetti di tipo tossico o infiammatorio nei modelli cellulari utilizzati.

BIBLIOGRAFIA

- Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Frohlich JA, Grobler AC, Baxter C, et al. CAPRISA 004 Trial Group. **“Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women”**. *Science* (2010) 329:1168–1174.
- Abu-Amer, Erdmann, Alexopoulou, Kollias, Ross, Teitelbaum **“Tumor necrosis factor receptors types 1 and 2 differentially regulate osteoclastogenesis”** *The Journal of Virology Chemistry* (2000) 27:27307-10
- Acharya P, Luongo TS, Louder MK, McKee K, et al. **“Structural basis for highly effective HIV-1 neutralization by CD4-mimetic miniproteins revealed by 1.5 Å cocrystal structure of gp120 and M48U1”**. *Structure* (2013) 21:1018-1029.
- Agot K, Taylor D, Corneli AL, Wang M, Ambia J, Kashuba AD, Parker C, Lemons A, Malahleha M, Lombaard J, Van Damme L **“Accuracy of Self-Report and Pill-Count Measures of Adherence in the FEM-PrEP Clinical Trial: Implications for Future HIV-Prevention Trials.”** *AIDS Behav.* (2015) 19:743-51
- Akira, Shizuo, Satoshi Uematsu, e Osamu Takeuchi. **“Pathogen recognition and innate immunity.”** *Cell* 124 (4) (2006): 783-801.
- Albini, A, R Soldi, D Giunciuglio, E Giraud, R Benelli, L Primo, D Noonan, et al. **“The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-**

- 1/KDR receptor on vascular endothelial cells.”** *Nature Medicine* 2 (12) (1996): 1371-1375.
- Alexander, Christopher S, Valentina Montessori, Brian Wynhoven, Winnie Dong, Keith Chan, Michael V O’Shaughnessy, Theresa Mo, Magda Piaseczny, Julio S G Montaner, e P Richard Harrigan. **“Prevalence and response to antiretroviral therapy of non-B subtypes of HIV in antiretroviral-naïve individuals in British Columbia.”** *Antiviral Therapy* 7 (1) (2002): 31-35
 - Alimonti, Judie B, T Blake Ball, e Keith R Fowke. **“Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS.”** *The Journal of General Virology* 84 (Pt 7) (2003): 1649-1661.
 - Ameisen, J C. **“Programmed cell death (apoptosis) and cell survival regulation: relevance to AIDS and cancer.”** *AIDS (London, England)* 8 (9) (1994): 1197-1213.
 - Anderson, Clarke **“Matrix vesicles and calcification”** *Current Rheumatology Reports* (2003) 5 (3):222-6
 - Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. **“Causes of death in HIV-1-infected patients treated with antiretroviral therapy, 1996-2006: collaborative analysis of 13 HIV cohort studies.”** *Clin Infect Dis.* 50 (10) (2010):1387-1396.
 - Arora, Vivek K, Brenda L Fredericksen, e J Victor Garcia. **“Nef: agent of cell subversion.”** *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 4 (2) (2002): 189-199.

- Attia S, Egger M, Müller M, Zwahlen M, Low N. **“Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis”**. *AIDS*. 23 (11) (2009):1397-1404.
- Aubin JE, Liu F. The osteoblast lineage. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, editors. **“Principles of bone biology.”** San Diego: *Academic Press* (1996) 51–68.
- Balzarini, J. *et al.* **“The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium* hybrid and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication *in vitro*”**. *Antiviral Res.* 18, (1992): 191–207.
- Barillari Giovanni e Barbara Ensoli. **“Angiogenic effect of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and its role in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi’s sarcoma”**. *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2) (1996): 1371-1375.
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM. **“Chemokine receptor as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.”** *Annu Rev Immunol* 17 (1999): 657-700.
- Blair, Athanasao **“Recent advance in osteoclast biology and pathological bone resorption”** *Histology and Histopathology* (2004) 19 (1):189-99
- Bon I, Lembo D, Rusnati M, Clò A, Morini S, Miserocchi A, Bugatti A, Grigolon S, Musumeci G, Landolfo S, Re MC, Gibellini D **“Peptide-**

derivatized SB105-A10 dendrimer inhibits the infectivity of R5 and X4 HIV-1 strains in primary PBMCs and cervicovaginal histocultures” *PLoS One* (2013) 8:e76482

- Bon I, Lembo D, Rusnati M, Clò A, Morini S, Miserocchi A, Bugatti A, Grigolon S, Musumeci G, Landolfo S, Re MC, Gibellini D **“Peptide-derivatized SB105-A10 dendrimer inhibits the infectivity of R5 and X4 HIV-1 strains in primary PBMCs and cervicovaginal histocultures”** *PLoS One*. (2013) 8:e76482.
- Borderi M, Gibellini D, Vescini F, et al. **”Metabolic bone disease in HIV infection”**. *AIDS*. 2009 23:1297–310.
- Bouchemal K, Frelichowska J, Martin L, et al. **“Note on the formulation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal hydrogels containing the miniCD4 M48U1 as anti-HIV-1 microbicide”**. *Int. J. Pharm.* 2013 454:649-652.
- **Bouchemal K, Martin L, Gibellini D, Lembo D et al.** “Thermosensitive and mucoadhesive pluronic-hydroxypropylmethylcellulose hydrogel containing the mini-CD4 M48U1 is a promising efficient barrier against HIV diffusion through macaque cervicovaginal mucus” *Antimicrobs Agents Chemother.* 2015 59 (4):2215-22
- Boyd, M. R. *et al.* **” Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development”**. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, (1997): 1521–1530.
- Boyle, William, Scott, Lacey **“Osteoclast differentiation and activation”** *Nature* 2003 423 (6937):337-42

- Brown and Qaqish “**Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review**” *AIDS* 2006 Nov 14;20 (17):2165-74
- Brown PO. Integration IN: J.M. Coffin, Varmus HE, eds retroviruses. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997:161-20.
- Brown TT, McComsey GA. “**Osteopenia and osteoporosis in patients with HIV: a review of current concepts**”. *Curr Inf Dis Reports*. 2006 8:162–70.
- Bu, Rongfa, Borsysenko, Li, Cao, Sabokar, Blair “**Expression and function of TNF-family proteins and receptors in human osteoblast**” *Bone* 2003 33 (5):760-70
- Buchbinder, S P, M H Katz, N A Hessel, P M O’Malley, e S D Holmberg. “**Long-term HIV-1 infection without immunologic progression.**” *AIDS (London, England)* 8 (8) (1994): 1123-1128.
- Buckley, K A, Hipskind, Gartland, Bowler, Gallagher “**Adenosine triphosphate stimulates human osteoclast activity via upregulation of osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand**” *Bone* 2002 31(5): 582-90
- Bukrinskaya AG. “**HIV-1 assembly and maturation.**” *Archives of virology* 149 (2004).
- Buonaguro, L, G Barillari, H K Chang, C A Bohan, V Kao, R Morgan, R C Gallo, e B Ensoli. “**Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines.**” *Journal of Virology* 66 (12) (1992): 7159-7167.

- Burger, Klein-Nulend, Smith “**Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon – a proposal**” *Journal of Biomechanics* 2003 36 (10):1453-9
- Calarese, D. A. *et al.* “**Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition**”. *Science* 300, (2003): 2065–2071.
- Campbell S, Vogt VM. “**Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1**”. *J Virol* 69 (1995):6487-6497
- Cannon P. M., Matthews S., Clark N., Byles E. D., Iourin O., Hockley D: J., Kingsman S. M., Kingsman A. J. “**Structure-function studies of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein, p17**”. *Journal of Virology* 71 (5) (1997): 3474-3483.
- Cannon P. M., Matthews S., Clark N., Byles E. D., Iourin O., Hockley D: J., Kingsman S. M., Kingsman A. J. “**Structure-function studies of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein, p17**”. *Journal of Virology* 71 (5) (1997): 3474-3483.
- Carbonare LD, Innamorati G, Valenti M. “**Transcription Factor Runx2 and its Application to Bone Tissue Engineering**”. *Stem Cell Rev and Rep.* 2012 8 (3):891–897.

- Carr A, Miller J, Eisman JA, Cooper DA **“Osteopenia in HIV-infected men: association with asymptomatic lactic acidemia and lower weight pre-antiretroviral therapy.”** *AIDS* 2001 Apr 13;15 (6):703-9.
- Castagna A, Spagnuolo V, Galli L, Vinci C, Nozza S, Carini E, D'Arminio Monforte A, Montella F, Antinori A, Di Biagio A, Rusconi S, Lazzarin **“A Simplification to atazanavir/ritonavir monotherapy for HIV-1 treated individuals on virological suppression: 48-week efficacy and safety results.”** MODAt Study Group. *AIDS*. 2014 Sep 24;28(15):2269-79
- Clarke B. **“Normal bone anatomy and physiology.”** *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 3:131– 139
- Cohen YZ, Dolin R. **“Novel HIV vaccine strategies: overview and perspective”.** *Therapeutic Advances in Vaccines*. (2013) 1:99-112.
- Colamn PM, Lawrence MC. **“The structural Biology of Type 1 Viral Membrane Fusion”.** *Molecular Cell Biology* 4 (2003)
- Collier A. C., Bozzette R., W. Coombs, D. A. Schoenfeld, R. I. Bassett, L. Corey et al. **“ Treatment of human immunodeficiency virus infection with Saquinavir, Zidovudine, and Zalcitabine”.** *N. Engl. J. Med.* **334** (1996): 1011-1018
- Colman, Peter M, e Michael C Lawrence. **“The structural biology of type I viral membrane fusion.”** *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (4) (2003): 309-319.
- D. W. Rogers, S. J. Gamblin, B. A. Harris, S. Ray, J. S. Culp, B. Hellmig, D. J. Woolf, C. Debouck, S. C. Harrison. **“The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1”.** *Proceedings*

of the National Academy Science of the United States of America 92 (4) (1995): 1222-1226.

- Daar ES, Li XL, Moudgil T, Ho DD. **“High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates.”** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 87:6574-6578.
- Dayton AI, Sodroski JG, Rosen CA et al. **“The *trans*-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III required for replication”.** *Cell* 44 (1986):941-947
- De Guzman, R. N., Z. R. Wu, C. C. Stalling, L. Pappalardo, P. N. Borrer, M. F. Summers. **“Structures of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNARECOGNITION element”.** *Science (New York, N. Y.)* 279 (5349) (1998): 384-388.
- Dean M, Carrington M, Winkler C et al. **“Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene.”** Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273 (1996):1856-1862.
- Deeks S. G. **“Treatment of antiretroviral drug resistance HIV-1 infection”.** *Lancet* 262 (2003): 2002-2011

- Delaissè, Andersen, Engsig, Henriksen, Troen, Blavier “**Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclast activities**” *Microscopy Research and Technique* 2003 61 (6):504-13
- Delaissè, Jean-marie, Andersen, Engsig, Henriksen, Troen, Blavier “**Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclasts activities**” *Microscopy Research and Technique*” 2003 61 (6):504-13
- Dereuddre-Bosquet N, Morellato-Castillo L, Brouwers J, Augustijns P, Bouchemalk, et al. “**MiniCD4 microbicide prevents HIV infection of human mucosal explants and vaginal transmission of SHIV(162P3) in cynomolgus macaques**”. *PLoS Pathog.* (2012) 8:e1003071
- Dereuddre-Bosquet N, Morellato-Castillo L, et al. “**MiniCD4 microbicide prevents HIV infection of human mucosal explants and vaginal transmission of SHIV(162P3) in cynomolgus macaques**” *PLoS Pathog.* 2012 8:e1003071
- Dion, Marie-Lise, Jean-François Poulin, Rebeka Bordi, Myriam Sylvestre, Rachel Corsini, Nadia Kettaf, Ali Dalloul, et al. “**HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation.**” *Immunity* 21 (6) (2004): 757-768.
- Dobnig, Turner “**Evidence that the intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells**” *Endocrinology* 1995 136 (8):3632-8
- Doms RW, Peiper SC. “**Unwelcomed guests with master key: How HIV uses chemokine receptors for cellular entry.**” *Virology* 235 (1997): 179-190

- Dube M. P., Sattler F. R. **“Metabolic complications of antiretroviral therapies”** *AIDS Clinical Care* 10 (1998) (6): 41-44
- Elion GB, Singer S, Hitchings GH. **“Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites.”** *J Biol Chem* 1954 208:477–488.
- Ellis, Ronald J, Patricia Calero, e Michael D Stockin. **“HIV infection and the central nervous system: a primer.”** *Neuropsychology Review* 19 (2) (2009): 144-151.
- Endres, MJ, Clapham PR, Marsh M et al. **“CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4”.** *Cell* 87 (1996): 745-756
- Everts V, Delaisse JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, et al. **“The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship’s Lacunae and Initiating bone formation”and Initiating Bone Formation.”** *J Bone Miner Res.* 2002 17 (1):77-90.
- Feed EO. HIV-1. **“Gag proteins: diverse functions in the virus life cycle”.** *Virology* 25 (1998):1-15
- Ferrari, Aldo, Vittorio Pellegrini, Caterina Arcangeli, Antonio Fittipaldi, Mauro Giacca, Fabio Beltram. **“Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 Tat fusion proteins visualized in real time”.** *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy* 8 (2) (2003): 284-294.

- Fischl M. A., D. D. Richman, M. H. Grieco, M. S. Gottlieb, D. King et al. **“The efficacy of azidothymine (AZT) in the treatment of patient with AIDS and AIDS-related complex. A double blind placebo controlled trial”**. *N. Engl. J. Med.* 317 (1987):185-191
- Fisher AG, Feinberg MB, Josephs SF et al. **“The *trans*-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication”**. *Nature* 320 (1986):367-371.
- Flexner C. **“HIV-protease inhibitor”** *N Engl J Med* 338 (1998) (18): 1281-1292
- Frankel, A. D., J. A. Young. **“HIV-1 fifteen proteins and an RNA”**. *Annual review of Biochemistry* 67 (1998): 1-25
- Freed E. O. **“HIV-1 gag protein: diverse function in the virus life cycle”**. *Virology* 251 (1) (1998): 1-15
- Freed EO. **“HIV replication”**. *Somatic cell and Molecular Genetics* 26 (2001):267-288.
- Furman PA, Fyfe JA, St Clair MH, Rideout JL, Mitsuya H et al. **“Phosphorylation of 5'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase”**. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (1986) (21):8333-7

- Gallagher JC, Sai AJ. **“Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis.”** *Maturitas* 2010 65(4):301–307.
- Gartner S, Popovic M **“Virus Isolation and production.”** In Aldovini A, Walker BD. Editors. *HIV techniques, Stockton Press NY* 1990 pp 53–69.
- Gibellini, D, G Zauli, M C Re, D Milani, G Furlini, E Caramelli, S Capitani, e M La Placa. **“Recombinant human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Tat protein sequentially up-regulates IL-6 and TGF-beta 1 mRNA expression and protein synthesis in peripheral blood monocytes.”** *British Journal of Haematology* 88 (2) (1994): 261-267.
- Gibellini, De Crignis, Ponti, Cimatti, Borderi, Tschon, Giardino, Re **“HIV-1 Trigger apoptosis in primary osteoblasts and HOBIT cells through TNFalpha activation”** *J Med Virol* 2008 Sep;80 (9):1507-14
- Gottlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG et al. **”Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release”.** *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991):3195-3199.
- Greenberg, M. L. & Cammack, N. **“Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor”.** *J. Antimicrob. Chemother.* 54,(2004): 333–340.
- Haim H, Si Z, Madani N, Wang L, Courter JR, Princiotta A, Kassa A, DeGrace M, et al. **“Soluble CD4 and CD4-mimetic compounds inhibit HIV-1 infection by induction of a short-lived activated state”.** *PLoS Pathog.* 2009; 5:e1000360.
- Hammer SM, Eron JJ Jr, Reiss P, et al; International AIDS Society-USA. **“Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel.”** *JAMA.* 300 (5) (2008):555-570.

- Hansen, J. E. *et al.* **“Correlation between carbohydrate structures on the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 and HIV-2 and syncytium inhibition with lectins”**. *AIDS* 3, (1989): 635–641.
- Harrison T.R. *et al.* **“Harrison’s principles of internal medicine, 16th edition”** (2005) McGraw-Hill
- Hemelaar, Joris, Eleanor Gouws, Peter D Ghys, e Saladin Osmanov. **“Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004.”** *AIDS* (London, England) 20 (16) (2006): W13-23.
- Hemelaar, Joris, Eleanor Gouws, Peter D Ghys, e Saladin Osmanov. **“Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004.”** *AIDS* (London, England) 20 (16) (2006): W13-23.
- Hernandez CJ, Hazelwood SJ, Martin RB. **“The Relationship Between Basic Multicellular Unit Activation and Origination in Cancellous Bone.”** *Bone*. 1999 25 (5):585–587.
- Hill C. P., Worthylake D., Bancroft D. P., Christensen A. M., Sundquist W. I., **“Crystal structure of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implication for membrane association and assembly.”** *Proceedings of the National Accademy of Sciences of the United States of America* 93 (7) (1996): 3099-3104.
- Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. **“ Receptor activator of nuclear**

factor-Kb ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases.” *Cancer*. 2001 92 (3):460–470.

- Hu, J., Gardner, M. B. & Miller, C. J. “**Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells**”. *J. Virol.* 74 (2000): 6087–6095
- Huang M, Orenstein JM, Martin MA et al. “**p6Gag is required for particle production from fulllength human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease**”. *J Virol* 69 (1995):6810-6818.
- Huang, Chinh-Chin, Ming, Tang, Mei-Yun Zhang, Shahzad Majeed, Elisabeth Montabana, Robyn L. Stanfield, Dimiter S. Dimitrov, et al. “**Structures of a V3-containing HIV-1 gp120 core**”. *Science (New York J Virol)* 74 (2000):548-3554
- J. Wang, S. J. Smerdon, J. Jager, L. A. Kohlstaedt, P. A. Rice, J. M. Friedman, T. A. Steitz. “**Structural basis of asymmetry in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer.**” *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America* 91 (15) (1994): 7242-7246.
- Kassem M, Abdallah BM, Saeed H. “**Osteoblastic cells: Differentiation and transdifferentiation.**” *Arch Biochem Biophys.* 2008 473 (2):183–187.
- Kaye JF, Lever AM. “**Nonreciprocal packaging of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 RNA: a possible role for the p2 domain of Gag in RNA encapsidation**”. *Journal of Virology* 72 (1998):5877-5885

- Kitahata MM, Gange SJ, Abraham AG, et al; NAACCORD Investigators. **“Effect of early versus deferred antiretroviral therapy for HIV on survival.”** *N Engl J Med.* 360 (18) (2009): 1815-1826.
- Kuritzkes DR, Lalama CM, Ribaud HJ et al., **“Preexisting resistance to non nucleoside reverse-transcriptase inhibitors predicts virological failure of an efavirenz-based regimen in treatment-naive HIV-1-infected subjects”.** *J Infect Dis* 197 (2008): 867-870
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA **“Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody”.** *Nature* 1998 393:648-659.
- Lederman MM, Offord RE, Hartley O **“Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV”.** *Nat Rev Immunol* (2006) 6:371–382.)
- Levesque, Karine, Yong-Sen Zhao, e Eric A Cohen. **“Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells.”** *The Journal of Biological Chemistry* 278 (30) (2003): 28346-28353.
- Levy JA. **“HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges”.** *AIDS.* 2009 23:147–60.
- Lidia Gazzola, Giusi Maria Bellistri, Camilla Tincati, Valentina Ierardi, Alessia Savoldi, Angelo del Dole, Luca Tagliabue, Antonella d’Arminio Monforte and Giulia Marchetti **“Association between peripheral T-Lymphocyte activation and impaired bone mineral density in HIV-infected patients”** *Journal of Translational Medicine* (2013) 11:51

- Lin PF, Blair W, Wang T, Spicer T, et al. **“A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding”** *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 16;100:11013-18
- Lin PF, Blair W, Wang T, Spicer T, Guo Q, Zhou N, Gong YF, Wang HG, Rose R, Yamanaka G, Robinson B, Li CB, Fridell R, Deminie C, Demers G, Yang Z, Zadajura L., Meanwell N, Colonno R. **“A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding”**. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2003). 16;100:11013-11018.
- Lo J. C., Mulligan K., Tai V. W., Algren H., Schambelan M. **“Buffalo Hump in men with HIV-1 infection”** *Lancet* **351** (1998) (9106): 867-70
- Loregian A, Mercorelli B, Muratore G, Sinigalia E, Pagni S, Massari S, Gribaudo G, Gatto B, Palumbo M, Tabarrini O, Cecchetti V, Palù G. **“The 6-aminoquinolone WC5 inhibits human cytomegalovirus replication at an early stage by interfering with the transactivating activity of viral immediate-early 2 protein.”** *Antimicrob Agents Chemother* 2010 54:1930-1940
- Luganini A, Nicoletto SF, Pizzuto L, Pirri G, Giuliani A, Landolfo S, Gribaudo G. **“Inhibition of herpes simplex virus type 1 and type 2 infections by peptide-derivatized dendrimers.”** *Antimicrob Agents Chemother* 2011 55:3231-3239.
- M.F. Summers , L. E. Henderson, M. R. Chance, J. W. Bess, T. L. South, P. R. Blake, I. Sagi, G. Perez-Alvado, R. C. Sowder, D. R. Hare. **“Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the**

- solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1.”** *Protein Science: A Publication of the Protein Society* **1** (5) (1992): 563-574.
- M.F. Summers , L. E. Henderson, M. R. Chance, J. W. Bess, T. L. South, P. R. Blake, I. Sagi, G. Perez-Alvado, R. C. Sowder, D. R. Hare. **“Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1.”** *Protein Science: A Publication of the Protein Society* **1** (5) (1992): 563-574.
 - Marchetti G, Gazzola L, Trabattoni D, Bai F, Ancona G, Ferraris L, Meroni L, Galli M, Clerici M, Gori A, D’Arminio Monforte A **“Skewed T-cell maturation and function in HIV-infected patients failing CD4+ recovery upon longterm virologically suppressive HAART”** *AIDS* 2010 24:1455–1460.
 - Marrazzo JM, Ramjee G, Richardson BA, et al VOICE Study Team **“Tenofovir-based preexposure prophylaxis for HIV infection among African women”** *N Engl J Med* 2015 372 (6):509-18
 - Martin G, Burke B, Thai R, et al. **“Stabilization of HIV-1 envelope in the CD4-bound conformation through specific cross-linking of a CD4 mimetic.”** *J. Biol. Chem.* 2011 286:21706-21716.
 - Martin G, Sun Y, Heyd B, Combes O, Ulmer JB, et al. **“A simple one-step method for the preparation of HIV envelope glycoprotein immunogens based on a CD4 mimic peptide”** *Virology* 2008 381:241-250.
 - Matsuo K, Irie N. **“Osteoclast–osteoblast communication.”** *Arch Biochem Biophys.* 2008;473:201–209

- Mayer, K. H. *et al.* **“Safety and tolerability of BufferGel, a novel vaginal microbicide, in women in the United States”**. *Clin. Infect. Dis.* 32, (2001): 476–482.
- McCutchan, Francine E. **“Global epidemiology of HIV.”** *Journal of Medical Virology* 78 Suppl 1 (2006): S7-S12.
- Merrill DP, Moonis M, Chou TC, Hirsch MS. **“Lamivudine or Stavudine in two-and three- drug combinations against human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro”**. *J Infect Dis* 2 (1996) (2): 355-364
- Minkin **“Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function”** *Calcified Tissue International* 1982 34:285-90
- Mitola, S, S Sozzani, W Luini, L Primo, A Borsatti, H Weich, e F Bussolino. **“Tat-human immunodeficiency virus-1 induces human monocyte chemotaxis by activation of vascular endothelial growth factor receptor-1.”** *Blood* 90 (4) (1997): 1365-1372.
- Monier P., McKown K., Bronze M. S. **“Osteonecrosis complicating highly active antiretroviral therapy in patients infected with human immunodeficiency virus”**. *Clin Infect Dis* 151 (2000) (5): 113-1118.
- Moore, J. P., Kitchen, S. G., Pugach, P. & Zack, J. A. **“The CCR5 and CXCR4 coreceptors central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection.”** *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20 (2004):111–126.
- Morris GC, Lacey CJ **“Microbicides and HIV prevention: lessons from the past, looking to the future”**. *Curr Opin Infect Dis* (2010) 23:57–63

- Müller B “**Cytokine imbalance in non-immunological chronic disease**”. *Cytokine* (2002), 18:334–339
- Murakami T, Freed EO. “**The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions**”. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000):343-348.
- Musumeci G, Bon I, Lembo D, Cagno V, Re MC, Signoretto C, Diani E, Martin L, Ponchel G, Gibellini D, Bouchemal K “**M48U1 and Tenofovir combination synergistically inhibits HIV infection in activated PBMCs and human cervicovaginal histocultures**” *Scientific Report Nature* SUBMITTED
- Nie, Z, D Bergeron, R A Subbramanian, X J Yao, F Checroune, N Rougeau, e E A Cohen. “**The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells.**” *Journal of Virology* 72 (5) (1998): 4104-4115.
- O. K. Haffar, S. Popov, L. Dubrovsky, I. Agostini, H. Tang, T. Pushkarsky, S. G. Nadler, M. Bukrinsky. “**Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate import of the HIV-1 pre-integration complex.**” *Journal of Molecular Biology* (2000) 299(2): 359-368.
- O. K. Haffar, S. Popov, L. Dubrovsky, I. Agostini, H. Tang, T. Pushkarsky, S. G. Nadler, M. Bukrinsky. “**Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate import of the HIV-1 pre-integration complex.**” *Journal of Molecular Biology* 299 (2) (2000): 359-368.

- Ofotokun I, McIntosh E, Weitzmann MN. **“HIV: inflammation and bone”**. *Curr HIV/AIDS Rep.* (2012) 9:16–25.
- Pantaleo, G, C Graziosi, e A S Fauci. **“New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection.”** *The New England Journal of Medicine* 328 (5) (1993): 327-335.
- Paredes R, Clotet B, **“Clinical management of HIV-1 resistance”** *Antiviral Res* 85 (2010): 245-265
- Peterlin, B Matija, e Didier Trono. **“Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication.”** *Nature Reviews. Immunology* 3 (2) (2003): 97-107.
- Peterlin, B. Matija, Didier Trono. **“Hise, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication”**. *Nature Reviews. Immunology* 3 (2) (2003): 97-107.
- Pillay D, Bhaskaran K, Jurriaans S et al., **“The impact of transmitted drug resistance on the natural history of HIV infection and response to first-line therapy”**. *AIDS* 20 (2006): 21-28
- Pillay, Deenan, A Sarah Walker, Diana M Gibb, Anita de Rossi, Steve Kaye, Mounir Ait-Khaled, Maria Muñoz-Fernandez, e Abdel Babiker. **“Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtypes on virologic response and emergence of drug resistance among children in the Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) 5 trial.”** *The Journal of Infectious Diseases* 186 (5) (2002): 617-625.

- Piscitelli S. **“Preventing dangerous drug interaction”**. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 40 (2000) suppl 1): S44-5
- Piscitelli S. C., Flexner C., Minor J. R., Polis M. A., Masur H. **“Drug interaction in patients infected with human immunodeficiency virus”** *Clin Infect Dis.* 23 (1996) (4): 685-693.
- Prichard MN, Shipman C., Jr **“A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions.”** *Antiviral Res* (1990) 14:181–205.
- Pugliese, A, V Vidotto, T Beltramo, S Petrini, e D Torre. **“A review of HIV-1 Tat protein biological effects.”** *Cell Biochemistry and Function* 23 (4) (2005): 223-227.
- Rieder P, Joos B, von Wyl V, et al; Swiss HIV Cohort Study. **“HIV-1 transmission after cessation of early antiretroviral therapy among men having sex with men.”** *AIDS.* 24 (8) (2010):1177-1183.
- Robbins. **“Pathologic Basis of Disease”**, WB. Saunders company, Philadelphia; 1999.
- Rodmann **“Cell biology of the osteoclast”** *Experimental Haematology* (1999) 27 (8):1229-41
- Romani, Bizhan, Susan Engelbrecht, e Richard H Glashoff. **“Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1.”** *The Journal of General Virology* 91 (2010): 1-12.

- Romerio, F, M N Gabriel, e D M Margolis. **“Repression of human immunodeficiency virus type 1 through the novel cooperation of human factors YY1 and LSF.”** *Journal of Virology* 71 (12) (1997): 9375-9382.
- Ryser, Hugues J-P, e Rudolf Flückiger. **“Progress in targeting HIV-1 entry.”** *Drug Discovery Today* 10 (16) (2005): 1085-1094.
- Saag MS, Cahn P, Raffi F et al., **“Efficacy of emtricitabine vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naïve patients”.** *JAMA* 292 (2004): 180-190
- Samson M, Libert F, Doranz BJ et al. **“Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.”** *Nature* 382 (1996):722-725.
- Selhorst P, Gruppig K, Tong T, Crooks ET, Martin L, Vanham G, Binley JM, Ariën KK. **“M48U1 CD4 mimetic has a sustained inhibitory effect on cell-associated HIV-1 by attenuating virion infectivity through gp120 shedding”.** *Retrovirology* (2013) 10:12.
- Sepúlveda-Crespo D, Gómez R, De La Mata FJ, Jiménez JL, Muñoz-Fernández MÁ. **“Polyanionic carbosilane dendrimer-conjugated antiviral drugs as efficient microbicides: Recent trends and developments in HIV treatment/therapy”** *Nanomedicine* (2015) 11:1481-1498.
- Sepúlveda-Crespo D, Gómez R, De La Mata FJ, Jiménez JL, Muñoz-Fernández MÁ. **“Polyanionic carbosilane dendrimer-conjugated antiviral drugs as efficient microbicides: Recent trends and developments in HIV**

- treatment/therapy**". *Nanomedicine*. (2015)11:1481-1498.
- Sheridan, P L, T P Mayall, E Verdin, e K A Jones. **"Histone acetyltransferases regulate HIV-1 enhancer activity in vitro."** *Genes & Development* 11 (24) (1997): 3327-3340.
 - Siliciano, J D, e R F Siliciano. **"Latency and viral persistence in HIV-1 infection."** *The Journal of Clinical Investigation* 106 (7) (2000): 823-825.
 - Silver, Murrills, Etherington **"Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts"** *Experimental Cell Research* 1988 175 (2):266-76
 - Silvestri, Guido, e Mark B Feinberg. **"Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection."** *The Journal of Clinical Investigation* 112 (6) (2003): 821-824.
 - Spagnuolo V, Borderi M, Musumeci G, Galli L, Tincati C, Rusconi S, Guaraldi G, Bigoloni A, Lazzarin A, Castagna A **"RANKL predicts 96-week BMD changes in ATV monotherapy: a MODAt trial sub-study"** Poster 773 CROI Seattle, Washington, Feb. 23-26 2015
 - Srivastava IK, Martin L. **"A simple one-step method for the preparation of HIV-1envelope glycoprotein immunogens based on a CD4 mimic peptide"** *Virology*. 2008 381:241-250.
 - Strebel, Klaus. **"Virus-host interaction: role of HIV proteins Vif, Tat and Rev"**. *AIDS (London, England)* 17 Suppl 4 (2003): S25-34.
 - Sullivan N, Sun Y, Li J, Hofmann W, Sodroski J. **"Replicative function and**

- neutralization sensitivity of envelope glycoproteins from primary and T-cell line-passaged human immunodeficiency virus type 1 isolates".** *J Virol.* 1995; 69:4413-4422.
- **Svicher V, D'Arrigo R, Alteri C, et al.** "Performance of genotyping tropism testing in clinical practice using the enhanced sensitivity version of Trofile as reference assay: result from the OSCAR Study Group" *New Microbiol.* 2010 33 (3):195-206
 - Tebas P, Powderly WG, Claxton S, Marin D, Tantisiriwat W, Teitelbaum SL, Yarashaki KE, **"Accelerated bone mineral loss in HIV-infected patients receiving potent antiretroviral therapy."** *AIDS* 2000 Mar 10;14 (4): F63-7.
 - Teitelbaum SL. **"Bone resorption by osteoclasts."** *Science* 2000 289 (5484):1504–1508.
 - Tyagi, M, M Rusnati, M Presta, e M Giacca. "Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans." *The Journal of Biological Chemistry* **276** (5) (2001): 3254-3261.
 - UNAIDS/WHO (2013a) Report on global AIDS epidemic. Geneva UNAIDS
 - UNAIDS/WHO (2013b) Fact sheet n°334. Geneva UNAIDS).
 - Van Herrewege Y, Morellato L, Descours A, Aerts L, Michiels J, Heyndrickx L, Martin L, Vanham G. **"CD4 mimetic miniproteins: potent anti-HIV compounds with promising activity as microbicides."** *J. Antimicrob. Chemoth.* 2008 61:818-826.

- Verani, Alessia, Gabriel Gras, e Gianfranco Pancino. **“Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons.”** *Molecular Immunology* 42 (2) (2005): 195-212.
- Vermeire K, Princen K, Hatse S, De Clercq E, Dey K, Bell TW, Schols D **“CADA, a novel CD4-targeted HIV inhibitor, is synergistic with various anti-HIV drugs in vitro”** *AIDS* 2004 18:2115-25.
- Vermeire K, Princen K, Hatse S, De Clercq E, Dey K, Bell TW, Schols D **“CADA, a novel CD4-targeted HIV inhibitor, is synergistic with various anti-HIV drugs in vitro”.** *AIDS*. (2004)18:2115-2125.
- Vescini, Cozzi-Lepri, Borderi, Re, Maggiolo, De Luca, Cassola, Vullo, Carosi, Antinori, Tozzi, Monforte, ICONA Foundatio Study group **“Prevalence of hypovitaminosis D and factors associated with vitamin D deficiency and morbidity among HIV-infected patients enrolled in a large Italian cohort.”** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011 Oct 1; 58 (2):163-72
- Viraben R., Acquilina C. **“Indinavir-associated lipodystrophy”.** *AIDS* **195** (1998) (6): F37-9
- Wielens, Jerome, Ian T. Crosby, David K. Chalmer. **“A three-dimensional model of the human immunodeficiency virus type 1 integration complex.”** *Journal of Computer-Aided Molecular Design* (2005) 19: 301-317.
- Womack JA, Goulet JL, Gibert C, et al. **“Increased risk of fragility fractures among HIV infected compared to uninfected male veterans.”** *PLoS ONE*. 2011 6:e17217.

- Yano, Shozo, Mentaverri, Kanuparthi, Bandyopadhyay, Rivera, Brown, Chattopadhyay **“Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblast: role of of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblast and regulation of its secretion by osteoblast and osteoclast”** *Endocrinology* 2005 146 (5):2324-35
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki SI, et al. **“Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin osteoclastogenesis inhibitory factor and is identical to RANCE/RANKL.”** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 95 (7):3597-3602
- Zack, J A, S J Arrigo, S R Weitsman, A S Go, A Haislip, e I S Chen. **“HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure.”** *Cell* 61 (2) (1990): 213-222.
- Zheng, Lin, Yi-da Yang, Guo.cai Lu e Maria S. Salvato. **“Extracellular HIV Tat and Tat cysteine rich peptide increase CCR5 expression in monocytes.”** *Journal of Zhejiang University. Science. B* 6 (7) (2005): 668-672.