

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Quinto programma nazionale
di ricerca sull'AIDS**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 2-6 maggio 2005

PROGRESS REPORT

A cura del
Centro di Coordinamento, organizzazione e verifica
dei progetti per la lotta all'AIDS

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
05/C1

Istituto Superiore di Sanità

Quinto Programma nazionale di ricerca sull'AIDS. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 2-6 maggio 2005. Progress report.

A cura del Centro di coordinamento organizzazione e verifica dei progetti per la lotta all'AIDS 2005, 332 p. ISTISAN Congressi 05/C1 (in italiano e inglese)

Il quinto Programma nazionale di ricerca sull'AIDS è suddiviso nei seguenti progetti: A1) Epidemiologia dell'HIV/AIDS; A2) Eziopatogenesi e studi immunologici e virologici dell'HIV/AIDS; A3a) Ricerca, clinica e terapia delle malattie da HIV; A3b) Coinfezioni, infezioni opportunistiche e tumori associati all'AIDS; B) Azione concertata italiana per lo sviluppo di un vaccino contro HIV/AIDS (ICAV); C) Aspetti psicosociali.

Parole chiave: AIDS, Programma nazionale di ricerca, Ricerca sanitaria, Sanità pubblica

Istituto Superiore di Sanità

Fifth National Research Program on AIDS. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 2-6 May 2005. Progress report.

Edited by the Centro di coordinamento, organizzazione e verifica dei progetti per la lotta all'AIDS 2005, 332 p. ISTISAN Congressi 05/C1 (in Italian and English)

The fifth National Research Program on AIDS is subdivided into the following projects: A1) HIV/AIDS Epidemiology; A2) HIV/AIDS Etiopathogenesis and immunological and virological studies; A3A) Clinical research and therapy of HIV disease; A3B) Coinfections, opportunistic infections and AIDS related tumors; B) Italian concerted action on the development of a vaccine against HIV/AIDS – ICAV; C) Psychological and social aspects of HIV/AIDS.

Key words: AIDS, National research project, Health research, Public health

Questo rapporto è a cura del Centro di coordinamento organizzazione e verifica dei progetti per la lotta all'AIDS:

Giovanni Caricati (*Responsabile*)
Veronica Bizzotti
Francesca Celletti
Mario Falchi
Flavia Fedeli
Valerio Occhiodoro

Si ringraziano della collaborazione per gli aspetti informatici Fabio Maccari, Mariano Santaquilani e Marco Tallon del Settore Informatico dell'Istituto Superiore di Sanità.

Per informazioni su questo documento scrivere a: progaid@iss.it

Il rapporto è disponibile online sul sito di questo Istituto: www.iss.it.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2005 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Progetto

Epidemiologia dell'HIV/AIDS

Responsabili scientifici

Dr. Leonardo PALOMBI e Dr. Giovanni REZZA..... 1

Progetto

Eziopatogenesi e studi immunologici e virologici dell'HIV/AIDS

Responsabili scientifici

Prof. Fernando AIUTI e Dr.ssa Barbara ENSOLI 27

Progetto

Ricerca clinica e terapia delle malattie da HIV

Responsabili scientifici

Prof. Mauro MORONI e Dr. Stefano VELLA..... 127

Progetto

Coinfezioni, infezioni opportunistiche e tumori associati all'AIDS

Responsabili scientifici

Prof. Antonio CASSONE e Prof. Luigi ORTONA..... 191

Progetto

Azione concertata italiana per lo sviluppo di un vaccino contro HIV/AIDS

Responsabili scientifici

Dr.ssa Barbara ENSOLI e Prof.ssa Paola VERANI 237

Progetto

Aspetti psicosociali

Responsabili scientifici

Prof. Antonio BOSCHINI e Dr. Giovanni REZZA 299

Indice degli autori 319

Progetto
Epidemiologia dell'HIV/AIDS

Responsabili scientifici
Prof. Leonardo PALOMBI e Dr. Giovanni REZZA

RISPOSTA ALLA TERAPIA ANTIRETROVIRALE IN UNA COORTE DI PAZIENTI HIV-POSITIVI CON MALATTIA NEUROLOGICA

Maria Letizia Giancola* (*IRCCS L. Spallanzani, Roma*); Maria Paola Trotta (*) ; Patrizia Lorenzini (*) ; Antonella Cingolani** (*Università Cattolica Sacro Cuore, Roma*); Simona Bossolasco*** (*IRCCS S. Raffaele, Milano*); Dora Larussa (*) ; Susanna Grisetti (*) ; Marco Bongiovanni° (*Ospedale L. Sacco, Milano*); Francesca Moretti (*Università degli Studi di Brescia*); Maria Grazia Finazzi (*Ospedali Riuniti di Bergamo*); Adriana Ammassari (**); Antonella D'Arminio Monforte (°); Paola Cinque (***) ; Andrea Antinori (*)

Background: Le patologie neurologiche rimangono tra le principali manifestazioni cliniche della malattia da HIV, tuttavia l'impatto delle patologie del SNC sull'efficacia clinica e viro-immunologica della terapia antiretrovirale non è stato ancora valutato dettagliatamente.

Metodi: IRINA (Italian Registry Investigation Neuro-AIDS) è uno studio multicentrico nazionale clinico-epidemiologico, sui nuovi casi di patologia neurologica HIV-relati. Da gennaio 2000, dai 45 centri partecipanti, sono stati segnalati oltre 1200 casi. Per la presente analisi sono stati selezionati tutti i pazienti (pz) con almeno 30 giorni di HAART dopo la diagnosi neurologica. Principali endpoints: 1) risposta virologica (RV: valori di HIV-RNA <50 cp/ml dopo 12 mesi di terapia antiretrovirale); 2) risposta immunologica (RI: aumento di almeno 100 cell/mmc dal baseline); 3) progressione clinica (PC: decesso o nuovo evento AIDS).

Risultati: 571 pz inclusi: alla diagnosi il 31.5% aveva un precedente evento AIDS; i valori mediani di CD4 e HIV-RNA plasmatico erano 68 cell/mmc (IQR 22-167) e 4.95 log₁₀ cp/ml (IQR 3.90-5.48); 280 (49%) pz erano naive, mentre 291 (51%) erano stati trattati per un tempo mediano di 64 (IQR 44-87) mesi. Per l'analisi è stato seguito un criterio intention to treat. Il 42% dei pz mostrava una RV (55% nei naive e 29% negli experienced). In analisi multivariata, i predittori di RV erano: una maggiore durata del primo schema di terapia dopo la diagnosi neurologica (AOR 1.06; 95% CI 1.00-1.13 per ogni mese di terapia) e i valori più bassi di viremia plasmatica dopo 6 mesi di terapia (AOR: 0.46; 0.35-0.60 per ogni log₁₀ in più). La RI veniva riscontrata nel 38% (50% nei naive e 25% negli experienced); un incremento di linfociti CD4 dopo 6 mesi di terapia si associava ad una probabilità aumentata di RI (AOR: 1.65 per ogni incremento di 50 cell/mmc; 95%CI 1.40-1.95). Dopo una mediana di 10 mesi (IQR 2-20) di osservazione, si osservavano 269 decessi e 76 nuovi eventi AIDS, con una probabilità stimata del 61% ad 1 anno dalla diagnosi. Al modello multivariato di Cox, la diagnosi di PML (AHR: 2.51; 95%CI 1.00-6.03), di PCNSL o localizzazioni al SNC di linfomi non-Hodgkin (AHR: 5.07; 95%CI 1.44-17.79) e la tossicodipendenza (AHR 2.09; 95%CI 1.16-3.74) si associavano ad un aumentato rischio di PC. Fattori predittivi di risposta clinica erano: l'aver iniziato terapia HAART dopo la diagnosi neurologica (AHR: 0.23; 95%CI 0.09-0.57), e l'iniziale risposta virologica (AHR: 0.77 per ogni log₁₀ di riduzione di HIV-RNA; 95%CI 0.65-0.92) ed immunologica (AHR: 0.76 per ogni incremento di 50 cell/mmc; 95%CI 0.65-0.89) dopo 6 mesi. Nel sottogruppo di pz naive, l'unico predittore di RV era la RV precoce, mentre i predittori di RI erano la RI precoce ed una maggiore durata del primo schema di terapia dopo la diagnosi. Dopo una mediana di 18 mesi di osservazione: 42 decessi e 28 nuovi eventi AIDS (probabilità a 1 anno: 21%). La RI a 6 mesi era l'unico fattore associato alla PC.

Conclusioni: La presenza di malattia neurologica non sembra inficiare l'efficacia viro-immunologica della terapia, mentre è determinante per l'outcome clinico. La risposta precoce è essenziale per il raggiungimento di un successo sostenuto nel tempo.

Contributo: 20F.1

UTILIZZO DEL TEST DELLA DETERMINAZIONE DELL'INDICE DI AVIDITÀ DEGLI ANTICORPI ANTI-HIV PER IDENTIFICARE LE INFEZIONI RECENTI IN CAMPIONI DI INDIVIDUI EUROPEI ED AFRICANI INFETTATI DA CEPPI DI HIV-1 APPARTENENTI A DIFFERENTI SOTTOTIPI

Daniela Bernasconi* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Lara Tavoschi (*); Michele Chiappi (*); Eftyhia Vardas (*CHBH, Johannesburg*); Claudia Rovetto (*); Barbara Suligoi (*); Barbara Ensoli (*); Stefano Buttò (*)

Background: La determinazione del tasso di incidenza di infezione da HIV, in particolare nei paesi in via di sviluppo, più colpiti dalla diffusione del virus, è chiave per acquisire conoscenze sulle caratteristiche della trasmissione dell'HIV nella popolazione e mettere in atto strategie atte a contenerne la diffusione. I tassi di incidenza di infezione si calcolano attraverso studi longitudinali mirati a determinare nuove sier conversionsi. Ciò è però costoso e difficile da organizzare. Recentemente è stato proposto l'utilizzo di test commerciali per la determinazione degli anticorpi contro l'HIV, che, opportunamente modificati, possono permettere di identificare le sier conversionsi recenti e, pertanto, essere utilizzati per stimare l'incidenza di infezione in una determinata popolazione. Queste procedure si basano sulla determinazione dell'avidità dell'anticorpo verso gli antigeni HIV, la quale aumenta nel tempo dalla sier conversione. Tale procedura, essendo poco costosa e non complicata, può efficacemente essere utilizzata nei paesi in via di sviluppo. Il progetto consiste nel valutare l'efficacia del calcolo dell'indice di avidità (AI index) per studi di incidenza in paesi africani, quali Sudafrica e Swaziland, ad alta prevalenza di infezione.

Metodi: È stato compiuto uno studio retrospettivo longitudinale, utilizzando campioni di siero sequenziali da 47 individui infettati da ceppi di HIV appartenenti al sottotipo B, con data di sier conversione nota. Ogni siero è stato saggiato in doppio tramite il kit commerciale AxSYM HIV1/2gO (Abbott Diagnostics Division) con la procedura raccomandata dal produttore, diluito 1:10 o con tampone fosfato o con guanidina 1M che compete per il legame dell'anticorpo con l'antigene. L'AI è stato calcolato come: $AI = OD \text{ campione (con Guanidina) / cut-off (del kit) / OD \text{ campione (con tampone) / cut-off (del kit)}$.

Risultati: L'AI è risultato incrementare progressivamente nel tempo. In particolare, in campioni da individui sier convertiti entro i 3 mesi e di quelli sier convertiti da 4 a 6 mesi prima, la media dei valori di AI era di $0,64 \pm 0,10$ SD e di $0,74 \pm 0,19$ SD, rispettivamente. Dopo i 6 mesi e, maggiormente, dopo il primo anno, l'AI tendeva ad aumentare notevolmente ($0,90 \pm 0,15$ SD, $0,94 \pm 0,16$ SD e $0,99 \pm 0,10$ SD per i campioni ottenuti da individui sier convertiti da 7 a 9, da 10 a 12 e >12 mesi prima, rispettivamente). Questi dati sono stati ottenuti in pazienti italiani infettati da ceppi del sottotipo B. Per individui infettati da altri sottotipi di HIV è necessario validare l'utilizzo di questo test per il calcolo dell'AI index. A tale proposito, abbiamo raccolto sieri da individui ugandesi con data di sier conversione nota, la maggior parte dei quali infettati con sottotipi non B. I dati preliminari indicano che il calcolo dell'AI index, tramite il test AxSYM, è in grado di identificare recenti sier conversionsi anche in individui infettati con ceppi di sottotipi non B.

Conclusioni: Il saggio di avidità potrebbe essere utilizzato in molti contesti, variando opportunamente i valori di AI. Sulla base della nostra esperienza si propone di utilizzare un valore di $AI < 0,8$ per studi di stima dell'incidenza di infezione. Le attività in Sudafrica e Swaziland (stima dell'incidenza in popolazioni di questi due paesi), descritte nel progetto, saranno effettuate dopo la validazione, già in corso, della procedura con sottotipi non B di HIV-1.

Contributo: 20F/A

EPIDEMIA NOSOCOMIALE DA HIV E HCV IN UNA COORTE DI BAMBINI LIBICI

Guido Castelli Gattinara* (*Ospedale Bambin Gesù, Roma*); Massimo Amicosante** (*Università degli Studi "Tor Vergata", Roma*); Alessandra M. Martino (*) ; Roberta D'Arrigo (**); Carla Montesano (**); Stefano Boros*** (*Istituto Superiore Sanità, Roma*); Alessandra Viganò (*Dip. di Pediatria, Università degli Studi di Milano*); Massimo Ciccozzi (***) ; Hyppolite Tchidjou Kuekou (*) ; Paolo Rossi (*Ospedale Bambin Gesù, Roma - Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Carlo Federico Perno (**)

Background: Nel 1998 si è verificata presso l'ospedale "El-Fath" di Benghazi in Libia un'epidemia nosocomiale da HIV, che ha coinvolto 418 bambini, 18 madri nutrici di bambini infetti e 2 infermiere. Nel periodo 1999-2001 molti di questi bambini sono stati seguiti presso vari Istituti clinici italiani dove è stato iniziato un follow-up clinico con stoccaggio di materiale biologico.

Metodi: Nella prima fase dello studio si è provveduto alla raccolta, centralizzazione e inserimento in un database dei dati clinici con classificazione dei bambini in un unico elenco. Sui campioni biologici sono state iniziate le analisi del genotipo virale dell'HIV con sequenziamento dell'intero gene GAG e dei geni regolatori (vif, vpr, tat1) e del genotipo virale dell'HCV sulla glicoproteina dell'envelope E1/E2 nei bambini con HCV-RNA > 1000 copie/ml.

Risultati: Nello studio è stata inserita ampia parte di questa coorte: 248 bambini sul totale dei 418 infetti (59%). I bambini (139 maschi/109 femmine) avevano un'età media di 3.9+4.1 anni. L'analisi dei dati alla prima osservazione ha evidenziato che la percentuale media dei linfociti CD4 era del 28% (range 7-54%) e che 23/248 bambini (9.3%) avevano un grave deficit immunitario (CDC classe 3). La valutazione dei fattori correlati all'immunodeficit (CD4 < 25%) ha indicato che il rischio di immunocompromissione precoce tende ad aumentare con l'età (OR=0.94 per ogni anno, 95% CI 0.87-1.01). Il genere femminile è risultato tendenzialmente protettivo anche se l'associazione è solo marginalmente significativa (OR=0.59, 95% CI 0.34-1.02). Dal punto di vista virologico solo 27 bambini (11.8%) avevano un HIV-RNA < 400 copie/mL, mentre 82/248 (36%) avevano un viral load > 100.000 copie/ml. La coinfezione con il virus HCV è stata dimostrata in 75/174 (43.1%) bambini. In questo campione la coinfezione HIV-HCV non è risultata associata con bassi valori di CD4 (OR= 1.12, 95%CI 0.63-1.99). In tutti i casi analizzati l'infezione da HIV è risultata determinata da un ceppo ricombinante A/G CRF-02 e l'analisi filogenetica ha dimostrato un elevato grado di analogie tra campioni indipendenti. Tali dati confermerebbero l'ipotesi che tutti i bambini si siano infettati con lo stesso ceppo virale in un breve periodo di tempo verosimilmente attraverso strumenti ospedalieri contaminati. Mentre le sequenze dell'HIV hanno mostrato strette analogie, le varianti dell'HCV sono risultate separate in tre differenti cluster: 23 sequenze appartenenti al genotipo 1a e, rispettivamente, 22 e 11 sequenze appartenenti al genotipo 4. Le divergenti sequenze relative all'HCV suggeriscono l'esistenza di esposizioni multiple in un più lungo periodo di tempo. L'analisi preliminare dei dati ha inoltre permesso di stimare che la maggior parte delle infezioni si sono verificate nel 1998, con solo sporadici casi nel 1997.

Conclusioni: I dati di sieroincidenza confermano l'ipotesi di una trasmissione nosocomiale sia dell'HIV sia dell'HCV attraverso iniezioni parenterali non sterili, somministrate ai bambini durante la metà del 1998. La diversità delle sequenze dell'HCV suggeriscono ripetute esposizioni a sangue o prodotti ematici contaminati mentre minore sarebbe stata l'esposizione a sangue contaminato con l'HIV. In questa coorte la coinfezione con l'HCV non è risultata associata con bassi livelli di CD4.

Contributo: 20F.2

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF HIV-1 IN ALBANIA

Marjeta Dervishi* (*IShp*); Massimo Ciccozzi** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Stefano Boros (**); Caterina Gori*** (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Maria Jose Ruiz Alvarez (**); Arjan Harxhi (*); Shpetim Qyra (*); Nicola Schinaia (**); Roberta D'Arrigo (**); Francesca Ceccherini Silberstein (**); Silva Bino (*); Carlo Federico Perno (**); Giovanni Rezza (**)

Background: L'incidenza di AIDS in Albania è aumentata negli ultimi anni, passando da un tasso di incidenza di 0.3 per milione nel 1996 ad un tasso di incidenza di 3.2 per milione nel 2002. Tuttavia non si hanno informazioni sui sottotipi di HIV-1 realmente circolanti nel paese, così come non si hanno informazioni circa le eventuali resistenze ai trattamenti antiretrovirali.

Metodi: Analisi molecolare e filogenetica è stata eseguita per una classificazione genotipica e per una valutazione delle resistenze agli antiretrovirali utilizzando la regione genica del gene pol di HIV-1. Il campione utilizzato comprendeva 72 campioni sierologici di individui HIV-1 positivi provenienti da differenti regioni, che rappresentavano la metà dei casi di AIDS noti in Albania.

Risultati: La classificazione genotipica è stata eseguita su 66 (91.6%) campioni: 43 (65%) sono stati classificati come sottotipi Non B (37 sottotipi A, 4 sottotipi C, 1 sottotipo D e una probabile forma ricombinante di tipi BA). Tutte le relazioni filogenetiche sono state supportate dall'analisi di bootstrap (per il calcolo della probabilità dei nodi dell'albero filogenetico) e dall'analisi per calcolare la probabilità di lunghezza dei rami (zero branch length test). L'analisi per le resistenze genotipiche non ha identificato nessuna mutazione primaria nella regione della proteasi (PR) mentre ha identificato alcune mutazioni primarie nella regione della trascrittasi inversa (RT).

Conclusioni: Il sottotipo non-B è stato individuato come sottotipo dominante in Albania, anche se risulta il sottotipo B maggiormente presente nei paesi confinanti. Il 56% dei sottotipi A oggi presenti nel territorio albanese fanno gruppo tutti insieme nell'albero filogenetico, e questo clustering ristretto insieme al tasso elevato di incidenza delle infezioni con questo sottotipo rispetto ai sottotipi B, negli anni più recenti, suggerisce che il sottotipo A può essere di nuova introduzione. Una bassa ma consistente prevalenza delle resistenze agli antiretrovirali in una popolazione completamente naïve porta a pensare che una elevata proporzione di infezioni può essere stata acquisita da altri paesi.

Contributo: 20F/B

CONFRONTO DEL SARCOMA DI KAPOSI CLASSICO ED AIDS-CORRELATO IN ITALIA, 1985-1998

Luigino Dal Maso* (*CRO, Aviano*); Jerry Polesel (*) ; Maurizio Ponz De Leon (*AIRT*); Giovanni Rezza (*Registro Nazionale AIDS, Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Silvia Franceschi (*IARC, Lione*)

Background: L'incidenza del sarcoma di Kaposi (SK) è aumentata in tutti i paesi occidentali dopo l'inizio dell'epidemia di AIDS ed è diventata difficile la valutazione delle incidenze del SK classico (SKC) e AIDS-correlato (SKA) attraverso gli usuali strumenti di epidemiologia descrittiva. L'obiettivo dello studio è stato di confrontare l'incidenza e la presentazione dei SKC e SKA.

Metodi: I SKC e i SKA sono stati distinti utilizzando procedure di incrocio sistematico dei dati del Registro nazionale AIDS (RAIDS) e quelli dei registri tumori (RT) italiani che coprono quasi 12 milioni di abitanti (21% della popolazione Italiana). Un software 'ad hoc' (Software for Automated Linkage in Italy, SALI) è stato sviluppato per effettuare il record linkage. SALI ha utilizzato in modo criptato nomi, cognomi e date di nascita tenendo conto dei più comuni errori di trascrizione. Tutti gli identificativi personali sono nascosti agli operatori durante il processo e vengono rimossi alla fine della procedura. Lo studio è stato ristretto ai soggetti: (1) con diagnosi di SK tra il 1985 e il 1998; (2) residenti in area coperta da un RT; (3) con SK in un periodo completo per RAIDS e RT. I trapiantati e i SK identificati solo tramite il certificato di morte sono stati esclusi. Un SK è stato considerato SKA se: (a) si verificava in un soggetto con AIDS notificato al RAIDS; (b) nel certificato di morte, l'AIDS era una delle cause menzionate (c) nella documentazione dei RT era nota l'infezione da HIV (test HIV-positivo, dimissione o morte per AIDS). Per i criteri (b) and (c), 16 KS non linkati sono stati riclassificati come SKA, negli altri casi i soggetti sono stati considerati SKC. I tassi di incidenza sono stati standardizzati per sesso ed età secondo il metodo diretto.

Risultati: Tra il 1985 e il 1998, lo studio ha permesso di registrare 874 SKC e 634 SKA. Le età mediane dei casi erano, rispettivamente, 72 (range 18-95) e 36 anni (range 19-83). I SKC rappresentavano il 97% di tutti i SK nei soggetti con oltre 65 anni di età e una quota non trascurabile (42%) dei SK nei maschi tra 40 e 64 anni. La pelle era il sito di presentazione di SK più frequente in entrambi i gruppi, 88% nei SKC e 86% nei SKA. Il 10% dei SKA erano diagnosticati nelle labbra, cavo orale, faringe e organi digestivi, rispetto a solo il 3% per i SKC. Nessuna correlazione è emersa tra le incidenze di SKA e SKC nelle diverse aree ($r=-0,16$ nei maschi e $0,38$ nelle femmine). Dopo l'introduzione delle terapie artiretrovirali (HAART) nel 1996, l'incidenza del SKA è calata da oltre 2/100, alla fine degli anni '80, a 0,9/100 anni-persona nei soggetti con AIDS. Al contrario le incidenze di SKC sono rimaste costanti (circa 1 caso per 100.000 anni-persona) dal 1985 in poi. Tra i SKC i tassi di incidenza erano 3 volte più alti per i soggetti nati al Sud (1,6/100.000) rispetto a quelli nati nell'Italia Centro-Settentrionale (0,5/100.000).

Conclusioni: La sieroprevalenza dell'HHV8 (human herpes virus-8) nella popolazione generale è molto correlata l'incidenza di SKC, ma non con quella di SKA. In Italia, a differenza della maggior parte dei paesi occidentali, oltre la metà dei SK non sono attribuibili all'infezione da HIV e le due epidemie (SKA e SKC) appaiono indipendenti. La prosecuzione di studi di popolazione capaci di distinguere accuratamente le due forme di SK consentirà di monitorare l'incidenza di entrambe e contribuirà alla ricerca dei fattori (immunologici o altro) legati allo sviluppo del SK nei soggetti con e senza infezione da HIV.

Contributo: 20F.3

SORVEGLIANZA DELL'INFEZIONE DA HIV IN NORD UGANDA: TREND DI PREVALENZA E FATTORI ASSOCIATI CON L'INFEZIONE

Massimo Fabiani* (*CNESPS, Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Barbara Nattabi** (*St. Mary's Hospital Lacor, Gulu, Uganda*); Emington O. Ayella (**); Martin Ogwang (**); Alessia Ranghiasi (*); Silvia Declich (*)

Background: In Uganda, il sistema di sorveglianza sentinella dell'HIV tra le donne gravide afferenti alle cliniche prenatali è attivo dal 1989 e attualmente include 19 cliniche disseminate in 18 dei 56 distretti nazionali. Questi siti sono localizzati principalmente in aree urbane della regione centro-meridionale del Paese. Il sito sentinella istituito dall'ISS nel 1993 presso la clinica prenatale dell'ospedale St. Mary's Lacor, situato nel distretto rurale di Gulu nel Nord Uganda, concorre ad aumentare la rappresentatività geografica del sistema di sorveglianza Ugandese. Nei pochi mesi intercorsi dall'attivazione dell'attuale finanziamento, sono state svolte prevalentemente attività logistiche, organizzative e di raccolta dati che non hanno ancora prodotto risultati scientifici. Di conseguenza, questa relazione si limita a presentare l'andamento della prevalenza dell'HIV in Nord Uganda e i fattori associati con l'infezione nel periodo 2000-2003.

Metodi: Nel periodo di studio, un totale di 16.876 donne residenti nel distretto di Gulu sono state visitate presso la clinica prenatale dell'ospedale St. Mary's Lacor. Informazioni sulle caratteristiche socio-demografiche delle donne e sulla loro storia riproduttiva sono state raccolte, e un campione stratificato per età di 4.472 donne è stato testato anonimamente per l'infezione da HIV. La prevalenza annuale standardizzata per età è stata calcolata usando come riferimento la distribuzione per età di tutte le donne nel periodo di studio. I fattori associati con l'infezione HIV sono stati valutati con un'analisi multivariata utilizzando modelli di regressione logistica.

Risultati: Nel periodo 2000-2003, la prevalenza HIV complessiva e specifica per età è rimasta sostanzialmente stabile. La prevalenza standardizzata per età è scesa dal 12,1% nel 2000 all'11,3 nel 2003 ed è stata osservata solamente una lieve diminuzione tra le donne di età compresa tra i 20 e i 24 anni (dal 13,1% nel 2000 al 9,8% nel 2003). I fattori associati con l'infezione HIV sono risultati l'età maggiore di 25 anni [odds ratio aggiustato (OR)=1,69, intervallo di confidenza (IC) 95%: 1,06-2,67], la breve durata di residenza all'attuale indirizzo (OR=1,36, IC 95%: 1,06-1,76), l'essere non formalmente sposate (OR=2,23, 95% IC: 1,27-2,03), l'elevata età del partner (25-34 anni: OR=1,86, IC 95%: 1,28-2,71; ³ 35 anni: OR=2,65, IC 95%: 1,70-4,14) e l'occupazione del partner nel settore terziario (OR=1,96, IC 95%: 1,51-2,55).

Conclusioni: Le stime di prevalenza HIV hanno evidenziato un andamento stabile che è consistente con quello osservato a livello nazionale. La prevalenza in questo sito è comunque molto elevata ed è la più alta tra quelle osservate in Uganda, probabilmente a causa degli effetti della guerra civile che affligge il Nord Uganda da quasi 20 anni. Oltre all'età e alla mobilità residenziale, lo stato maritale e le caratteristiche del partner sono i fattori maggiormente associati con l'infezione da HIV. Questo risultato evidenzia l'importanza di promuovere l'adozione di misure preventive efficaci con il partner tra le donne che accedono alle sessioni di educazione sanitaria offerte nella clinica prenatale. La prosecuzione della sorveglianza sentinella in questo sito permetterà di continuare a monitorare la prevalenza da HIV in Nord Uganda e, attraverso la raccolta di informazioni aggiuntive, di identificare altri eventuali fattori associati con l'infezione.

Contributo: 20F/C

ANALISI DELLE TENDENZE TEMPORALI DELLE CAUSE DI MORTALITÀ IN UNA COORTE DI TOSSICODIPENDENTI MILANESI RECLUTATI DAL 1980 AL 1988

Massimo Galli* (*Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi di Milano*); Fulvio Adorni** (*ITBA-CNR, Milano*); Gianfranca Lovicu (*); Paolo Fedeli (*); Gabriele Codini (*); Massimo Musicco (**)

Background: L'infezione da HIV-1 aumenta il tasso di mortalità tra i tossicodipendenti per via endovenosa. Lo scopo di questo studio è di valutare l'impatto delle "tradizionali" cause di morte nei tossicodipendenti e di valutare i loro cambiamenti negli anni più recenti.

Metodi: Gli eroinomani afferenti a quattro NOT (attuali SERT) della città di Milano sono stati consecutivamente arruolati dal 1980 al 1988 in uno studio osservazionale. Il loro siero-stato virale è stato analizzato almeno una volta l'anno. Le cause di morte sono state determinate valutando i certificati di morte e, laddove possibile, le cartelle cliniche ed i referti autoptici.

Risultati: 3792 eroinomani sono stati seguiti fino al giugno 2004 per un totale di 48227 anni-persona e sono state osservate 1611 morti, con un tasso di mortalità generale di 33.4 (IC95% IC 31.8 – 35.0) per 1000 a-p. Il tasso di mortalità ha raggiunto il picco nel 1995 (68.1) parallelamente al picco di mortalità per AIDS (45.0). Dal 1996, la mortalità è drammaticamente diminuita. Nel 2003 il tasso di mortalità era di 15.6 (per AIDS di 5.8) per 1000 a-p. La morte per overdose ha toccato il picco nel 1990 (tasso di mortalità di 14.5) ed è rimasta come una rilevante causa di morte (4.3 nel 2003). La mortalità per cirrosi epatica e le sue complicanze sono progressivamente e significativamente aumentata nel corso del tempo ($p = 0.013$) ed attualmente si attesta attorno a valori del 25 % delle cause di morte tra i soggetti arruolati e deceduti nel 2002 e nel 2003. In un'analisi multivariata le donne presentano un rischio di morte più basso indipendentemente dalla causa ($p < 0.0001$), AIDS ($p = 0.011$) e cirrosi epatica ($p = 0.006$). Lo stato di sieropositività per HIV prima del 1989 sono ad un più alto rischio di morte per AIDS ($p < 0.0001$) ma non per overdose, violenza, cancro e cirrosi epatica rispetto ai sieronegativi o a quelli con sierostato non noto alla stessa data. I tassi di mortalità standardizzati nella coorte per il sesso e l'età è stato di 47.5 nel 1995 (oss 145/att 3.03) e 7.71 nel 2002 (oss 30/att 3.89). Escludendo AIDS tra le cause di morte, il tasso di mortalità standardizzato è passato da 9.2 nel 1995 al 5.6 nel 2003.

Conclusioni: La diminuzione della mortalità per AIDS è probabilmente legata all'introduzione del trattamento antiretrovirale ad alta efficacia. Nonostante la competizione delle morti per AIDS, i tossicodipendenti per via endovenosa mantengono un significativo eccesso di mortalità per cause differenti dall'AIDS e le cirrosi epatiche progressivamente aumentano, come atteso, data l'alta sieroprevalenza per HCV nella coorte. Parallelamente si sta osservando in questi ultimi anni un incremento significativo di mortalità per neoplasia, anche in considerazione dell'incremento dell'età media della popolazione arruolata.

Contributo: 20F.4

INFEZIONE DA HIV A TRASMISSIONE VERTICALE: DETERMINAZIONE DEI TASSI DI INFEZIONE, DELLA STORIA NATURALE E DEI FATTORI AD ESSA CORRELATI (STUDIO COLLABORATIVO EUROPEO)

Osvalda Rampon* (*Dip. di Pediatria, Università degli Studi di Padova*); Annarosa Del Mistro** (*Istituto di Oncologia, Università degli Studi di Padova*); Anita De Rossi (**); Antonio Mazza (*Pediatria di Trento*); Ruggiero D'Elia (*); Carlo Giaquinto (*)

Background: Nel 1985 abbiamo iniziato in collaborazione con i centri pediatrici di Berlino, Edimburgo e Londra lo Studio Collaborativo Europeo (ECS) per valutare la storia naturale dell'infezione da HIV nei figli di madre sieropositiva con particolare riferimento alla gravidanza e ai fattori associati ad infezione e malattia nella madre e nel bambino. Al dicembre 2004 sono risultati arruolati e seguiti prospetticamente nell'ECS 4574 madri e 4557 bambini. La lunghezza media del follow-up è di 8.45 anni per i bambini infetti e di 63.9 mesi per i non infetti. A Padova sono stati sinora seguiti 519 bambini nati da madre HIV positiva; 381 sono seguiti dalla nascita e quindi inclusi nello studio prospettico. Questa casistica è la più numerosa dell'ECS.

Metodi: Gli studi eseguiti nell'ambito dell'ECS hanno portato ad una definizione della frequenza di trasmissione dell'infezione da HIV dalla madre al figlio, dei fattori di rischio per la trasmissione, incluso l'uso di farmaci antiretrovirali e del taglio cesareo, della storia naturale dell'infezione, di particolari condizioni cliniche e del ruolo dei linfociti CD4.

Risultati: Un'analisi pubblicata ha dimostrato come i bambini nati dopo il 1994 siano per la maggior parte del tempo asintomatici e abbiano una progressione clinica verso l'AIDS significativamente inferiore rispetto ai nati negli anni precedenti, grazie alla terapia con ART. La continuità assistenziale fornita a questi pazienti ha consentito la creazione di una stretta relazione tra famiglia e staff medico in grado di facilitare la comunicazione e l'aderenza alla terapia. I problemi di aderenza sono comuni tra gli adolescenti con malattie croniche ed i bambini e gli adolescenti con HIV non fanno eccezione. Tra i bambini di 10 o più anni inclusi nell'ECS la percentuale di comunicazione dell'infezione è alta (77%). Sono state studiate le variazioni individuali e le differenze dei livelli di HIV-RNA dalla nascita fino al 15° anno di vita. Dopo un picco della viremia verso il 3° mese di vita si ha un rapido declino nei primi 5 anni di vita. Inoltre l'HIV-RNA nei primi 18 mesi di vita è costantemente più elevato nelle femmine non in terapia che nei maschi. Queste variazioni potrebbero indicare possibili dinamiche sesso-correlate nella replicazione virale ed avere importanti implicazioni per l'inizio della terapia antiretrovirale nei bambini. In collaborazione con il gruppo PENTA e il Registro Italiano abbiamo in corso uno studio per valutare le caratteristiche della terapia antiretrovirale utilizzata in Europa nei bambini. Abbiamo studiato l'eventuale effetto a lungo termine della ART somministrata in gravidanza su 2414 bambini non infetti nati da madre HIV positiva (follow-up medio 2.2 anni). L'osservazione preliminare non ha portato ad identificare alcuna patologia clinica riconducibile ad un danno mitocondriale. Il follow-up a lungo termine dei bambini arruolati nell'ECS ha evidenziato che i bambini non infetti esposti all'ART mostrano una differenza nella conta dei linfociti associata al sesso e alla razza, per cui i bambini africani hanno un numero di linfociti inferiore a quello dei bambini caucasici. È stato inoltre dimostrato che i bambini africani non infetti ed infetti hanno una conta di neutrofili inferiore ai bambini caucasici. La rilevanza clinica di questi ridotti livelli di neutrofili e di linfociti richiede ulteriori indagini.

Contributo: 20F.5

DIFFUSIONE DELL'INFEZIONE DA HIV TRA LE PARTORIENTI ED IMPATTO DELLE TERAPIE ANTIRETROVIRALI SUL TASSO DI TRASMISSIONE VERTICALE DI HIV IN ITALIA

Enrico Girardi* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Paola Vanacore (*); Francesco Costa (*CRI*); Maura Mezzetti (*Università Bocconi, Milano*); Maria Carmela Solmone (*); Maria Rosaria Capobianchi (*); Giuseppe Ippolito (*)

Background: La conoscenza delle dimensioni e delle dinamiche della diffusione dell'infezione da HIV tra le donne in età fertile rappresenta lo strumento indispensabile per la pianificazione sia degli interventi di prevenzione sia delle attività assistenziali rivolte alle donne ed ai bambini con infezione da HIV. In particolare, per quanto riguarda l'ultimo decennio, questi dati possono essere anche utilizzati per valutare l'impatto delle terapie antiretrovirali sulla trasmissione verticale dell'infezione.

Metodi: A partire dal 1991 viene condotta un'indagine nazionale nella quale viene saggiato per anti-HIV l'eluato dei residui dei campioni ematici raccolti nella prima settimana di vita su carta da filtro per l'esecuzione degli screening delle malattie metaboliche e ormonali di tutti i nati nell'ultimo trimestre dell'anno. Sulla base dei dati di prevalenza ottenuti e dei dati di incidenza dell'AIDS pediatrico (Registro Nazionale AIDS) al dicembre 2003 è stato costruito inoltre un modello per stimare il tasso di trasmissione verticale di HIV per i nati negli anni 1991-1999.

Risultati: La proporzione di nati da madre con HIV (per 1000) negli anni 1991-1999, 2001 e 2003 è stata: 1.00 - 0.84 - 0.97- 1.03- 0.87-0.74-0.58-0.85-1.01- 0.89- 0.71. Non si sono inoltre osservate variazioni nelle proporzioni relative della prevalenza per aree geografiche. Il tasso di trasmissione verticale [IC 95%] stimato per i nati negli anni 1991-1999 è stato 0.23 [0.17- 0.32]-0.23 [0.16- 0.33]-0.16 [0.11-0.23]-0.10 [0.06-0.14]-0.17 [0.11- 0.25]-0.14 [0.08- 0.22]-0.09 [0.05- 0.16]-0.03 [0.01-0.06]-0.02 [0.01- 0.06].

Conclusioni: I dati osservati sono compatibili con una situazione di sostanziale stazionarietà dell'infezione tra le donne in età fertile. Il modello sviluppato, che fornisce stime compatibili con i dati ottenuti da studi osservazionali, mostra invece una nettissima diminuzione del tasso di trasmissione verticale di HIV verificatosi in Italia parallelamente al diffondersi delle terapie antiretrovirali.

PARTECIPANTI ALLO STUDIO: A. Lelli; I. Antonozzi, Roma; R. Beghini, Verona; R. Ciannamea, Lecce; I. Bucci, Chieti; M. Tonacchera, Tirrenia; C. Corbetta, Milano; L. Palillo, Palermo; S. Pagliardini, Torino; R. Caldarera, Messina; D. Gullo, Catania; A. Misserini, Taranto; G. Parlato, Catanzaro; E. Pasquini, Firenze; S. Piazzini, Bologna; A. Pignero, Napoli; C. Pintor, Cagliari; G. Pugliese, Potenza; C. Romano; U. Caruso, Genova; M. Burrioni, Fano.

Contributo: 20F.6

STUDI OSSERVAZIONALI E REGISTRI HIV - SORVEGLIANZA E CONTROLLO DELLE INFEZIONI DA HIV E DA ALTRI PATOGENI A TRASMISSIONE EMATICA NELLE STRUTTURE SANITARIE

Giuseppe Ippolito* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Vincenzo Puro (*); Gabriella De Carli (*)

Background: I profondi cambiamenti nell'epidemia di infezione da HIV che si sono determinati soprattutto grazie all'introduzione della HAART, hanno avuto ricadute anche nel campo dell'epidemiologia occupazionale dell'infezione. Il miglioramento delle condizioni di salute dei soggetti infetti che accedono al trattamento ha determinato una minore necessità e frequenza di procedure diagnostiche e terapeutiche invasive e, conseguentemente, una minore probabilità da parte degli operatori sanitari di andare incontro ad esposizioni a rischio. Non è però noto quale sia l'impatto sull'epidemiologia occupazionale del mancato o inadeguato accesso alle terapie (late testers, fallimenti terapeutici). Un'analisi negli ospedali del SIROH dal 1994 al 2000 aveva evidenziato una significativa diminuzione della quota di esposizioni a fonte HIV+ (dal 4,3% del totale nel 1994 al 2,2% nel 2000), soprattutto per quanto riguardava gli incidenti durante inserzione o manipolazione di un catetere vascolare periferico (-80%). Tra il 2001 ed il 2002 si era però osservato un nuovo aumento della frequenza delle esposizioni con pazienti HIV+.

Metodi: Nei 55 ospedali partecipanti allo Studio Italiano Rischio Occupazionale da HIV (SIROH) sono state raccolte su schede standardizzate le caratteristiche specifiche di tutte le esposizioni occupazionali, percutanee (PC) e mucocutanee (MC), verificatesi dal 1994 al 2004, indipendentemente dallo stato sierologico del paziente. Le esposizioni ad HIV sono state analizzate separatamente. I dati relativi alla viremia nella fonte sono stati raccolti dal 2000.

Risultati: Nel periodo 1994-2004 sono stati raccolti dati su 47,800 incidenti occupazionali a rischio biologico: 36,421 PC e 11,379 MC. Di queste, 959 e 1202 rispettivamente coinvolgevano pazienti con infezione da HIV. Delle esposizioni verificatesi nel quinquennio 2000-2004, la viremia nella fonte era disponibile nel 25% delle PC (71/291) e nel 12% delle MC (45/367); nel 16% e 22% dei pazienti fonte, rispettivamente, la viremia era undetectable, ma nel 40% e 36% dei casi la viremia era >50000 copie/ml (28 PC e 16 MC). Dei 658 esposti nel periodo considerato, 201 hanno intrapreso la profilassi post-esposizione (PPE) il 57% delle PC e il 23% delle MC. La frequenza di accettazione della PPE è andata aumentando stabilmente, dal 28,5% nel 1994 al 70,5% nel 2004; non è stata osservata un'associazione fra frequenza di accettazione della PPE e carica virale nella fonte. Nessun caso di infezione professionale da HIV si è verificato dopo il 1994, mentre sono stati osservati 3 casi di epatite C acuta dopo esposizione a pazienti coinfecti con HIV/HCV.

Conclusioni: Una quota non trascurabile di esposizioni occupazionali ad HIV si verifica con pazienti nei quali il controllo della viremia è subottimale, anche in era post-HAART. Questo potrebbe portare a ricadute importanti nel campo dell'epidemiologia occupazionale dell'infezione da HIV. Il ruolo della profilassi post-esposizione sembra essere sempre più importante.

Contributo: 20F.7

INCIDENZA DI INFEZIONI DA HIV E HCV TRA I TOSSICODIPENDENTI DEL NORD ITALIA

Alfredo Nicolosi* (CNR-ITB); Biancamaria Carulli (*); Patrizia Moi (*); Marco Villa (*); Maria Lea Correa Leite (*); per lo studio NISDA ((NISDA Study))

Background: La conoscenza dei tassi di incidenza dell'infezione da HIV fra i tossicodipendenti (TD) è fondamentale sia a scopi di ricerca sia a fini di sanità pubblica per la lotta all'AIDS. Lo studio NISDA, grazie alla sua durata (iniziato nel 1987) e alle sue dimensioni, si trova in una posizione unica per fornire stime sulle tendenze temporali dell'epidemia e dell'andamento della prevalenza dei fattori di rischio nella popolazione di tossicodipendenti del Nord Italia. Nell'ambito del NISDA abbiamo anche studiato la prevalenza delle più comuni infezioni virali tra i tossicodipendenti. Tra queste, le epatiti hanno acquisito un interesse crescente in quanto i progressi in virologia hanno permesso di identificare nuovi virus (o varianti). Per questo motivo abbiamo esteso il nostro studio alla misurazione dell'incidenza della epatite C.

Metodi: La popolazione studiata viene reclutata presso 35 SerT: Arcisate, Bergamo, Brescia, Casalpusterlengo, Cittiglio, Corsico, Crema, Cremona, Darfo/Breno, Domodossola, Gallarate, Gardone/Zanano, Gorgonzola, Gravellona/Omegna, Limbiate, Lodi, Melegnano, Merate, Milano-Forze Armate, Milano-Boifava, Montichiari, Monza, Pavia, Ponte San Pietro, Rho, Rozzano, S. Angelo Lodigiano, Saronno, Sesto Calende, Sondrio, Treviglio, Trezzo sull'Adda, Varese, Verbania, Vercate. Il Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Sondrio svolge compiti di riferimento per gli esami di laboratorio. A partire dal registro dei singoli SerT vengono compilate schede riepilogative ove sono registrati, in anonimo, i dati demografici, le caratteristiche e le visite di tutti i tossicodipendenti sieronegativi afferenti al SerT con la data e l'esito del test per la presenza di anticorpi anti-HIV e anti-HCV. Queste schede contengono i dati di base con cui viene calcolata l'incidenza. Il calcolo dei tassi di incidenza viene effettuato con il metodo delle persone-tempo, ed usando le medie mobili per le tendenze temporali.

Risultati: Tra il 1993 e il 2003, abbiamo arruolato 11.092 TD di cui 10.531 (8.753 maschi e 1.763 femmine) sono stati seguiti. La mediana dell'età all'arruolamento era di 27,6 anni per i maschi e di 26,3 per le femmine. Durante questo periodo sono state osservate 182 sieroconversioni per HIV (129 maschi e 53 femmine) tra i TD seguiti per 33.617 persone-anno (PA), di cui 28.415 tra i maschi e 5.202 tra le femmine. Il tasso di incidenza per 1.000 PA nell'intero periodo era 4,5 (IC 95% 3,2-5,4) nei maschi e 10,2 (IC 95% 7,7-13,3) nelle femmine. L'incidenza è diminuita da 5,1 nel 1993 a 3,8 nel 2003, grazie al suo dimezzamento tra i maschi, mentre è rimasta invariata nelle femmine. Per quanto riguarda l'epatite C, abbiamo effettuato l'indagine di prevalenza nel 2000 su tutti i TD negativi per l'HIV: su 846 esaminati la prevalenza era 71% nei maschi e 76% nelle femmine. Dal 2000 al 2003, sono stati seguiti 1143 TD negativi per HCV (898.57 PA maschi, 138.37 PA femmine) osservando 64 sieroconversioni (53 maschi e 11 femmine). Il tasso di incidenza per 100 PA nell'intero periodo era 3,4 (IC 95% 2,6-4,5) nei maschi e 4,0 (1,8-6,4) nelle femmine, con un'apparente tendenza all'aumento dal 2000 al 2003 in entrambi i sessi.

Conclusioni: Il nostro studio conferma che l'incidenza da infezione da HIV persiste nella popolazione dei tossicodipendenti italiani, soprattutto tra le femmine, che da dieci anni presentano un tasso pressoché stabile. L'infezione da HCV ha una altissima prevalenza fra i tossicodipendenti, e la sua incidenza è circa 10 volte maggiore dell'incidenza di HIV. Inoltre, sembra in aumento negli anni più recenti.

Contributo: 20F.10

ADERENZA AD UN PROGRAMMA DI PREVENZIONE DEL CERVICO-CARCINOMA IN UNA POPOLAZIONE DI DONNE HIV SIEROPOSITIVE: IMPIEGO DEL COUNSELLING “ATTIVO” E DI UN REGISTRO DI CALL/RE-CALL TELEFONICO

Josè R. Fiore (*Università degli Studi di Bari-Foggia*); Donato Raimondi* (*Università degli Studi di Bari*); Francesca Campanale (*); Maria Grazia Tateo (*); Fabrizio Ingrassia (*); Giuseppe Pastore (*)

Background: La prevenzione del cervico-carcinoma assume particolare rilevanza nelle donne HIV sieropositive. Tale popolazione, tuttavia, mostra una scarsa aderenza ai programmi di prevenzione ed al follow-up ginecologico.

Metodi: Abbiamo adottato una strategia d'intervento preventivo, di cui riportiamo i risultati ottenuti, basata su: - Istituzione di un Ambulatorio ginecologico dedicato, distaccato presso la Clinica di Malattie Infettive. - *Counselling* “attivo” dei medici ambulatoriali: questi, oltre a sensibilizzare le pazienti sull'importanza dell'esame ginecologico e della periodica esecuzione del Pap-test nella prevenzione del cervico-carcinoma, hanno invitato contestualmente le donne non ancora inserite nel programma a prenotare un controllo ginecologico, inserendole poi in un registro di *call/re-call* telefonico. - Le donne inserite nel registro, sono state contattate telefonicamente prima della data del primo controllo (o visita di follow-up) per confermare l'appuntamento ovvero per modificarne la data, se richiesto. In caso d'assenza a visita, le donne sono state ricontattate per fissare un nuovo appuntamento.

Risultati: Sono state contattate sinora 150 donne HIV positive, afferenti alla Clinica di Malattie Infettive, Università di Bari: tra queste 105 (70%) hanno aderito al programma, 40 hanno riferito di essere seguite presso altri Centri ginecologici, mentre solo 5 (3%) hanno rifiutato. Alle donne seguite presso altri Centri è stato chiesto di fornire documentazione delle visite ginecologiche effettuate, ottenuta in 37 casi (92%). Nel complesso, l'aderenza al primo controllo tra le 105 donne è stata del 100% e bassa è stata la perdita al follow-up nel corso del programma (3 donne, pari al 2%). È stato necessario, tuttavia, ricorrere ad un primo *re-call*, per assenza a visita, in circa un quarto dei casi di primo controllo, e ad un secondo *re-call* in 5 casi (4%); l'aderenza al successivo follow-up (indipendentemente dall'eventuale presenza di alterazioni colposcopiche e/o citologiche riscontrate al primo controllo) è stato superiore al 90% con scarse assenze a visita. Rifiuto di aderire al programma di prevenzione, assenza a visita e perdita al follow-up sono apparsi significativamente correlati alla tossicodipendenza, mentre stadio di malattia, deterioramento immunologico, assunzione di terapie antiretrovirali, patologie cervicovaginali (incluse malattie sessualmente trasmesse), partnership stabili, distanza del comune di residenza, scolarità e reddito riferito, non hanno influenzato l'aderenza da parte delle pazienti. Al primo controllo, il 25% circa dei Pap-test è risultato alterato ed è stato possibile diagnosticare 2 carcinomi in situ, saliti a 4 nel corso del follow-up.

Conclusioni: I nostri risultati indicano che è possibile implementare l'aderenza ad un programma di prevenzione del cervico-carcinoma in una popolazione di donne HIV infette, adottando strategie più incisive e migliorando l'accesso al servizio ginecologico. Ambulatori dedicati ubicati negli spazi degli ambulatori infettivologici, *counselling* “attivo” dell'infettivologo con invito a fissare contestualmente l'appuntamento per il controllo ginecologico, impiego di un registro per il *call/re-call* telefonico, consentono di raggiungere efficacemente un gran numero di pazienti, ottenendo una buona aderenza, duratura nel tempo. Ulteriori sforzi andranno compiuti, invece, per migliorare l'aderenza delle donne tossicodipendenti.

Contributo: 20F.11

INFEZIONI NOSOCOMIALI RESPIRATORIE E POST-CHIRURGICHE IN PAZIENTI HIV POSITIVI

Nicola Petrosillo (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Gruppo HIV e Infezioni Ospedaliere; Angelo Pan (*Policlinico di Brescia*); Pierluigi Viale (*Università degli Studi di Udine*)

Background: Malgrado gli importanti progressi realizzati in ambito chirurgico, le infezioni del sito chirurgico (ISC) sono frequenti ed associate a morbosità e mortalità significative. I dati relativi alle ISC nei pazienti immunodepressi in generale, e in particolare agli HIV positivi, sono scarsi e relativi a periodi precedenti o concomitanti con l'introduzione della terapia antiretrovirale di combinazione. La ricerca si propone di valutare l'incidenza di ISC nei pazienti HIV positivi sottoposti ad interventi chirurgici, di stimare i principali fattori di rischio, e di valutare l'appropriatezza della profilassi antibiotica perioperatoria.

Metodi: Lo studio è di tipo osservazionale, prospettico. Verranno arruolati tutti i pazienti HIV positivo seguiti presso i centri partecipanti al progetto GHIO (Gruppo HIV Infezioni Ospedaliere). Verranno raccolti per ogni paziente sottoposto ad intervento chirurgico (chirurgia addominale, chirurgia cardiovascolare, chirurgia ostetrico-ginecologica) dati relativi a: 1. caratteristiche anagrafiche; 2. caratteristiche viro-immunologiche dell'infezione da HIV; 3. presenza di eventuali coinfezioni (HBV, HCV) e di effetti collaterali da farmaci antiretrovirali, come la lipodistrofia; 4. fattori di rischio relativi all'ISC; 5. profilassi perioperatoria; 6. indice di rischio (punteggio ASA, durata dell'intervento, classe di intervento); 7. esito. Lo studio viene preceduto da una indagine retrospettiva eseguita in uno dei centri del GHIO.

Risultati: Lo studio retrospettivo eseguito nel centro di Brescia ha interessato una coorte di 1520 pazienti HIV positivi. Di questi ne sono stati studiati 829 nei quali è stata riscontrata una storia di interventi chirurgici in 229 (27,6%). Settantaquattro di essi sono stati dettagliatamente intervistati sul tipo di intervento e sulle complicanze postoperatorie. Il tasso di ISC è risultato superiore al 6%, oltre tre volte più elevato rispetto al tasso riportato dallo studio nordamericano NNISS, per interventi equivalenti, nella popolazione generale. Lo studio ha considerato tutti gli interventi chirurgici eseguiti dai pazienti dal momento del riscontro della sieropositività. Prevalevano gli interventi di chirurgia generale (31% del totale), quelli di chirurgia ortopedica (24%) e quelli ostetrico-ginecologici (22%). Lo studio ha mostrato come la profilassi antibiotica fosse stata eseguita in 22 pazienti su 46 interventi analizzati, e che fosse di durata superiore alle 48 ore in oltre un terzo dei casi. La concordanza con le linee guida internazionali, per quel che concerne la scelta della molecola, è stata dell'11%. È iniziato lo studio prospettico su interventi chirurgici selezionati (chirurgia addominale, chirurgia cardiovascolare, chirurgia ostetrico-ginecologica).

Conclusioni: La disponibilità di potenti terapie antiretrovirali di associazione ha determinato un grande cambiamento nella sopravvivenza dei soggetti affetti da infezione da HIV, che oggi presentano una aspettativa di vita nettamente più lunga rispetto ad un tempo. Questo incremento della sopravvivenza, associato ad un miglioramento delle condizioni cliniche generali dei pazienti affetti da infezione da HIV, implica la possibilità di un aumento del numero degli interventi a cui questi soggetti potranno essere sottoposti. L'indagine retrospettiva ha evidenziato un rischio non trascurabile di infezioni postoperatorie nei soggetti HIV positivi. I dati prospettici serviranno a meglio definire questo rischio sulla base degli indici specifici di gravità per tipologia di paziente, durata di intervento e classe dello stesso.

Contributo: 20F.12

EFFETTO DELLA COINFEZIONE HIV CON L'HERPES 8 SULLA RISPOSTA ALL'HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY (HAART)

Maria Dorrucchi* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Diego Serraino (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Massimo Andreoni (*UTV*); Benedetta Longo (*); Giovanni Rezza (*)

Background: Studiare l'effetto della coinfezione dell'HIV con l'herpesvirus 8 (HHV-8) sulla risposta immunologica e virologica all'HAART.

Metodi: I pazienti provengono dallo studio di coorte "Italian Seroconversion Study" (ISS) con i seguenti criteri di inclusione: sono stati testati per l'HHV-8 prima di iniziare l'HAART, al "baseline" avevano a disposizione una misurazione di CD4 e di carica virale dell'HIV. L'evento di interesse era il tempo dall'inizio dell'HAART fino alla risposta virologica (carica virale dell'HIV <500 copie m/L), o alla risposta immunologica (un incremento di almeno 200 CD4 cellule/ μ L rispetto al valore "baseline"). Tali tempi sono stati confrontati tra gli HIV-positivi con o senza HHV-8 applicando modelli multipli di Cox.

Risultati: La popolazione in studio consisteva di 74 individui, 62 (84%) uomini e 12 (16%) donne. L'età mediana era di 41 anni, 77% erano maschi omosessuali e il 23% eterosessuali. Il 50% era sieropositivo per l'HHV-8. Applicando l'analisi multipla (controllando all'HAART per: età, uso precedente di terapia antiretrovirale, numero assoluto di cellule CD4 e carica virale, diagnosi di AIDS), i pazienti HIV-HHV-8 coinfeziti hanno mostrato una probabilità ridotta di raggiungere l'"endpoint" immunologico ["relative hazard" (RH)= 0.46, 95% CI: 0.22-0.94]. Similmente, la coinfezione dell'HHV-8 con l'HIV si è rivelata un predittore di evoluzione virologica più lenta (RH = 0.42, 95% CI: 0.23-0.74). Un numero crescente di titoli anti-HHV-8 sembrava, inoltre, essere associato a una diminuzione del rischio di risposta immunologica e virologica.

Conclusioni: La coinfezione dell'HIV con l'HHV-8 sembra influenzare la risposta immunologica e virologica dell'HAART.

Contributo: 20F/D

ASPETTI EPIDEMIOLOGICI DELL'INFEZIONE DA HIV, AIDS E IST IN ALBANIA E KOSOVO

N. Schinaia* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); L. Avellis (*); C. Bumbaca (*); I. Ibro (*); Y. Kodra (*); G. Rezza (*); S. Bino** (*ISP*); M. Dervishi (**); R. Bani (**); M. Basho (**); A. Harxhi (*Ospedale Madre Teresa, Tirana*); E. Kakarriqi (**)

Background: In questi ultimi 10-12 anni sono enormemente aumentati i contatti fra il nostro paese e la penisola balcanica, sia nel senso di movimento più o meno incontrollato di persone e merci, sia nel senso di contatti, collaborazioni ed assistenza tecnico-scientifica. Nel quadro dei programmi di cooperazione sanitaria che l'ISS ha condotto da molti anni nella regione balcanica, di recente sono state messe a punto alcune attività volte a migliorare la sorveglianza, in vista di un sostegno ai Programmi Nazionali di Lotta all'AIDS. L'esperienza che l'ISS ha in questo ambito e, in generale, l'Italia, ha reso il nostro paese un partner ideale per il supporto ai paesi della regione balcanica. In Albania l'istituzione scientifica nazionale di riferimento per il controllo dell'HIV è l'Istituto Nazionale di Sanità Pubblica (ISP) di Tirana. Nella conduzione delle attività di sorveglianza epidemiologica delle infezioni da HIV/AIDS e ST, l'ISP opera con numerose istituzioni partner, pubbliche, non governative e internazionali. L'ISS è ben integrato con questi partner. È stata avviata una collaborazione fra ISS e OMS in Kosovo, per contribuire al miglioramento delle attività di sorveglianza epidemiologica e controllo delle infezioni da HIV/AIDS e ST. Gli obiettivi del progetto sono l'effettuazione di studi epidemiologici sul campo e l'ottimizzazione del sistema di sorveglianza di prima e seconda generazione in Albania, Kosovo e Macedonia.

Metodi: Al fine di migliorare il sistema di sorveglianza sono state realizzate attività di formazione per Formatori, ossia specialisti di nazionalità albanese di riferimento per le attività di controllo dell'AIDS. Tali attività sono state incentrate sulla predisposizione di archivi informatizzati dei vari set di dati (td, sifilide e HIV, HIV e AIDS, donatori di sangue). Sono state predisposte delle schede standardizzate informatizzate per la raccolta dei dati. L'attività di sorveglianza di prima generazione è stata riorganizzata dall'ISP solo di recente; per cui sono stati condotti i seguenti studi epidemiologici descrittivi: HIV e sifilide nei campioni sieropositivi; HIV e sifilide negli emigrati; HIV, epatite e Sifilide nei tossicodipendenti; HIV e MST nei donatori di sangue avvalendosi di dati esistenti in loco.

Risultati: Vengono presentati i soli dati dello studio epidemiologico dell'HIV nei tossicodipendenti. Nel periodo 1995-2003 sono stati visti 2227 pazienti; di questi il 75% proveniva da Tirana, seguono Durazzo, Shkodra, Elbasani, Fieri, Berati, Vlora. la maggior parte dei tossicodipendenti sono maschi (95%) e la fascia più colpita è tra i 15 ed i 25 anni (80%); si evidenzia un aumento nella fascia d'età tra 13-14 anni. Il tipo di droga più utilizzato è l'eroina, con sensibile aumento dell'uso di droghe per via endovenosa (soprattutto eroina) solo negli ultimi 2-3 anni.

Conclusioni: Tali risultati dimostrano un probabile incremento esponenziale di pazienti HIV+ tra i tossicodipendenti. Verranno approfonditi altri studi in Albania, Kosovo e Macedonia. In particolare, verrà migliorata la qualità e l'efficienza della sorveglianza di prima generazione nei seguenti gruppi bersaglio (al momento più facili da studiare): persone che fanno il test per la sifilide (donatori, emigrati, volontari, malati), tossicodipendenti, di cui è importante capire quanti rifiutano il test, ovvero se sono td i.v., ad alto rischio o no, emigranti e donatori.

Contributo: 20F/E

KAPOSI'S SARCOMA IN TRANSPLANT AND IN HIV-INFECTED PERSONS: AN EPIDEMIOLOGICAL STUDY IN ITALY AND FRANCE

Claudio Angeletti* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Pierluca Piselli (*); Stefania Bellelli (*); Diego Serraino (*); M. Patrizia Carrieri (*INSERM, Marsiglia*); Benedetta Longo** (*Istituto Superiore Sanità, Roma*); Christian Pradier (*Nice Univ. Hospital*); Eloisa Arbustini (*IRCCS S. Matteo, Pavia*); Franco Citterio (*Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Ghil Busnack (*Ospedale Niguarda, Milano*); Patrizia Burra (*Università degli Studi di Padova*); Luigino Dal Maso (*CRO, Aviano*); Gianni Rezza (**)

Background: The increasing use of immunosuppressive drugs in the clinical setting of organ transplantation, and the worldwide epidemics of HIV infection and AIDS have shown that the risks of virus-associated cancers may be increased up to hundreds times in persons with immune impairment. Although Kaposi's sarcoma (KS) is one of the commonest of these cancers, no studies have compared KS patterns between the two major population groups with acquired immunosuppression, i.e., persons with HIV/AIDS and recipients of organ allografts. To gain epidemiological insight into KS viral oncogenesis, we used longitudinal data from six cohorts of persons with acquired immune deficiencies in Italy and in France to assess and compare incidence and determinants of KS.

Methods: Data from the DMI-2 HIV clinical database (Nice, France), the Italian HIV Seroconversion Study (ISS), and the clinical databases of four transplant centres from northern and central Italy were used. 8074 HIV-positive persons (6072 from France and 2002 HIV-seroconverters from Italy) and 2705 Italian transplants (1844 kidney transplants, 702 heart transplants and 159 liver transplants) were followed up between 1970 and 2004. Person years (PY) at risk of KS started from the date of HIV seroconversion, or date of first HIV-positive test or of date of organ transplant and ended upon at KS diagnosis, death, or date of last follow-up visit, whichever occurred first.

Results: Incidence rates (IR) for KS were higher in HIV-infected persons (7.22/100 000) than in transplants (1.79/100 000). In comparison with the sex- and age-matched general population, KS was 451-fold more frequent in HIV-infected persons and 128-fold more frequent in transplants. Higher KS risks were observed in HIV-infected homosexual men (incidence rate ratio-IRR=9.7, in France; IRR=6.7 in Italy), as compared to intravenous drug users, and in Italian transplants born in the South (IRR= 5.2, 95% confidence intervals: 1.8-15.2), as compared to those born in the North. Increasing CD4+ cell counts and treatment with HAART were associated with reduced KS risks in HIV-infected patients. In both pre- and post-HAART periods, KS in HIV-seroconverters started to rise later and at a lesser extent than among transplants up to nearly four years since HIV seroconversion or transplant. Thereafter, the probability of developing KS strongly increased among HIV-infected patients in the pre-HAART period, whereas in HIV-infected patients in the post-HAART period the pattern of KS progression overlapped with that observed in transplant patients.

Conclusions: This comparison of epidemiological aspects of KS in the setting of acquired immunodeficiencies has highlighted that HIV-infected persons have higher rates of KS than recipients of solid organ transplants and that different cofactors act in the two groups. The degree of immunosuppression appeared to be a very strong determinant of KS occurrence, particularly when high levels are reached in a short time interval like in the early post-transplant phase.

Grant: 20F.13

CARATTERISTICHE FENOTIPICHE E GENOTIPICHE DI CEPPI DI *NEISSERIA GONORRHOEAE* ISOLATI IN PAZIENTI HIV POSITIVI E NEGATIVI: RISULTATI PRELIMINARI

Paola Stefanelli* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Carmen Vasta (*); Barbara Suligoi (*)

Background: Non sono noti studi di caratterizzazione fenotipica e genotipica di *Neisseria gonorrhoeae* isolata in Italia ed in particolare di ceppi isolati da pazienti HIV positivi. I dati riportati da molti Paesi industrializzati evidenziano un aumento dei casi di gonorrea negli anni più recenti. È infatti noto l'effetto sinergico che hanno le malattie a trasmissione sessuale e l'infezione da HIV nel potenziarsi reciprocamente. In Italia non è stata mai attivata una sorveglianza per le resistenze antimicrobiche del gonococco, nonostante i dati internazionali riportino un aumento progressivo dei ceppi di gonococco resistenti sia agli antibiotici classici che a quelli di più recente introduzione. Questo studio si propone di analizzare le caratteristiche dei ceppi di gonococco in pazienti HIV-positivi e HIV-negativi al fine di valutare, non soltanto eventuali diversità negli aspetti biomolecolari dei ceppi isolati, ma anche differenze dal punto di vista clinico e terapeutico (gravità clinica, reinfezioni, cronicizzazione) che possano avere un impatto sull'epidemia da HIV.

Metodi: La sierotipizzazione è stata eseguita mediante una reazione di co-agglutinazione su vetrino utilizzando anticorpi policlonali anti-proteina PI (Phadebact, Sweden). La sensibilità agli antibiotici è stata determinata con il metodo E-Test. La regione dei geni *opa* di ~ 555 bp è stata amplificata utilizzando gli stessi oligonucleotidi e le stesse condizioni di amplificazione pubblicate in *Epidemiol. and Infect.*, 2001, 126: 219-224. I ceppi di *N. gonorrhoeae* resistenti alla penicillina e positivi al test cromogeno con Nitrocefina sono stati analizzati mediante PCR multiplex (*J. Antimicrob. Chemother.*, 45:777-782) per l'identificazione del tipo di plasmide produttore di β -lattamasi. Sono state amplificate e sequenziate le QRDRs dei geni *gyrA* e *parC*.

Risultati: Da aprile 2004 sono stati inviati all'ISS 223 ceppi di *N. gonorrhoeae* di cui 19 isolati da pazienti HIV+ (8,52%). In entrambe le popolazioni di pazienti, le infezioni da *N. gonorrhoeae* sono per lo più in soggetti di sesso maschile. L'età media è risultata più alta, 38,5 anni nei pazienti HIV+ vs una media di 32,25 anni nei pazienti HIV-. La diagnosi più frequente è risultata l'uretrite (72%) sia tra gli HIV+ che tra gli HIV-, seguita dalle cerviciti (18%). Il sierotipo prevalente è il sierotipo 1B. L'analisi molecolare dei geni *gyrA* e *parC* dei ceppi resistenti alla ciprofloxacina ha evidenziato le stesse mutazioni sia nei ceppi isolati da pazienti HIV+ che HIV-. I ceppi di *N. gonorrhoeae* penicillina resistenti e positivi al test cromogeno con Nitrocefina sono risultati, tramite screening in PCR multiplex, portatori di plasmidi produttori di β -lattamasi: il plasmide Toronto/Rio è il più rappresentato (70%) sia nei ceppi isolati da pazienti HIV+ che HIV-. Dei 7 *opati* finora identificati, l'*opati* 1 è il più rappresentato sia tra i ceppi isolati da pazienti HIV+ che HIV-.

Conclusioni: Lo studio ha permesso di individuare un clone maggiormente rappresentato sia tra i ceppi di *N. gonorrhoeae* isolati da pazienti HIV+ che in pazienti HIV- (*opati* 1) e appartenenti allo stesso sierotipo, 1B. Inoltre il 58% dei ceppi isolati da pazienti HIV+ è risultato resistente a uno o più antibiotici, percentuale più elevata rispetto a quanto osservato in ceppi isolati da pazienti HIV-. Sono state evidenziate le stesse mutazioni puntiformi nei geni coinvolti nella resistenza alla ciprofloxacina e gli stessi plasmidi produttori di β -lattamasi nei ceppi resistenti sia isolati da pazienti HIV+ che HIV-.

Contributo: 20F/F

APPLICAZIONE DEL TEST DI AVIDITÀ DEGLI ANTICORPI ANTI-HIV IN DIVERSE AREE ITALIANE AL FINE DI IDENTIFICARE LE INFEZIONI RECENTI DA HIV

Barbara Suligoi* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Vincenzo Bossi (*Ospedale Amedeo di Savoia, Torino*); Chiara Pasqualini (*Servizio Epidemiologia, Alessandria*); Giovanni Rezza (*)

Background: La sorveglianza dell'infezione da HIV si basa sulle nuove diagnosi di positività per anti-HIV, che però possono rappresentare vecchie infezioni non note in precedenza. In questo studio abbiamo adottato un nuovo indice sierologico (indice di avidità per Ab anti-HIV) (IA) per valutare la frequenza di infezioni recenti in pazienti sieropositivi. L'IA misura la maturità anticorpale che, come noto, è bassa nelle infezioni recenti per poi aumentare nelle fasi più avanzate d'infezione.

Metodi: Lo studio è stato condotto nella regione Piemonte su tutti i soggetti risultati anti-HIV+ per la prima volta. Ogni campione di siero risultato HIV+ con AxSYM HIV1/2gO (Abbott Diagnostici) e confermato con Western Blot, è stato saggiato con l'IA utilizzando lo stesso test di screening su due aliquote di siero, di cui una diluita con guanidina (un agente che evidenzia i sieri di infezioni recenti contenenti anticorpi a bassa avidità). Un $IA < 0,85$ è stato considerato indicativo di infezione recente (<6 mesi dalla sieroconversione). È stato anche confrontato il risultato dell'IA con il segnale del test di screening che, generalmente, in fase iniziale d'infezione mostra una reattività bassa, al fine di verificare se quest'ultimo potesse rappresentare di per sé un indicatore soddisfacente di infezione recente.

Risultati: Da novembre 2004 a febbraio 2005 sono risultati HIV positivi per la prima volta 105 soggetti. L'IA ha identificato 30 (29%) di questi come infezioni recenti; tra questi, solo il 68% presentava al test di screening una bassa reattività (sample/cutoff <15), mentre tutti i soggetti con un IA indicativo di infezione vecchia presentavano una reattività elevata al test di screening.

Conclusioni: I risultati finora ottenuti indicano che nella regione Piemonte quasi un terzo delle nuove diagnosi di HIV è costituito da infezioni recenti. La valutazione dell'IA è risultata semplice, riproducibile ed economica. Inoltre, l'IA appare più sensibile di una bassa reattività al test di screening che, se considerato isolatamente, avrebbe mancato di identificare 2/3 dei casi di infezioni recenti. La regione Veneto ha attivato da poco un sistema analogo a quello del Piemonte per valutare l'IA in tutte le persone con una prima diagnosi di HIV. L'estensione di questo progetto ad altre aree italiane consentirà per la prima volta di stimare l'incidenza delle infezioni da HIV confrontando la diffusione attuale del virus in regioni e sottogruppi di popolazione diversi.

Contributo: 20F/G

IDENTIFICAZIONE DELLE INFEZIONI RECENTI DA HIV IN UN UNICO CAMPIONE DI SIERO: CONFRONTO FRA IL TEST DI AVIDITÀ PER ANTICORPI ANTI-HIV E IL TEST STATUNITENSE STARHS

Barbara Suligoi* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Elisa Martrò** (*Universitat Autònoma Barcelona, Spagna*); Vincenzo Bossi*** (*Ospedale Amedeo di Savoia, Torino*); Mauro Sciandra (***) ; Joanne Mei (*CDC, Atlanta, USA*); Giovanni Rezza (*); Jordi Casabona (**)

Background: Negli ultimi anni è emerso un crescente interesse per test che consentano di identificare su un unico campione di siero le infezioni recenti da HIV, al fine di conoscere la diffusione attuale dell'HIV e fare stime di incidenza dell'infezione. Scopo della nostra ricerca è confrontare l'accuratezza di due test mirati a discriminare le infezioni recenti da HIV da quelle più vecchie su un unico campione di siero: 1) il test STARHS (serological testing algorithm for recent HIV seroconversion) messo a punto negli USA dai CDC di Atlanta, che si basa sull'aumento del titolo degli Ab anti-HIV dopo l'infezione; 2) l'indice di avidità (IA), messo a punto dal nostro gruppo di ricerca, che si basa sull'aumento della maturità anticorpale dopo l'infezione.

Metodi: Lo studio consiste in una raccolta retrospettiva di 150 sieri congelati di pazienti HIV+ (di cui 50 con data di sieroconversione nota) disponibili presso ospedali italiani e spagnoli. Tutti i sieri vengono testati in cieco con lo STARHS presso l'Univ. di Barcellona, e con il test di avidità presso l'osp. A. di Savoia di Torino, e successivamente vengono confrontati i risultati. I sieri raccolti entro 6 mesi dalla data di sieroconversione sono considerati come "infezioni recenti", mentre quelli con un lasso superiore come "infezioni vecchie".

Risultati: Fino ad oggi sono stati raccolti 46 sieri HIV+ senza data di sieroconversione e 30 sieri con data nota di sieroconversione (6 inf. recenti e 12 inf. vecchie). La concordanza fra i due test è risultata buona ($k=0,67$, $p<0,001$). Entrambi i test hanno mostrato un sensibilità del 100% mentre la specificità è stata del 91,7% per IA e 83,3% per STARHS. È in corso una valutazione della precisione, dei costi, della semplicità e dei tempi di esecuzione di ciascun test.

Conclusioni: I risultati preliminari indicano che entrambi i test hanno una buona sensibilità nell'identificare le infezioni recenti; tuttavia lo STARHS misclassifica i campioni di pazienti con infezioni vecchie più frequentemente rispetto all'IA. In termini operativi, lo STARHS richiede procedure estremamente complesse e non può essere esportato in altri laboratori che non ricevano direttamente dal CDC il materiale necessario per l'esecuzione del test. Il test di avidità, viceversa, è poco costoso, semplice da eseguire ed il fatto che venga effettuato in automatico garantisce la riproducibilità dei risultati.

Contributo: 20F/H

RICERCA DI ANTICORPI SPECIFICI, MEDIANTE UN NUOVO SAGGIO ELISA, CONTRO IL VIRUS ONCOGENO DELLA SCIMMIA SV40 IN PAZIENTI HIV+ E HIV

Mauro Tognon* (*Università degli Studi di Ferrara*); Alfredo Corallini (*); Fernanda Martini (*); Agnese Menegatti (*); Cristina Morelli (*)

Background: Il virus oncogeno della scimmia SV40 appartiene ai virus Polioma. SV40 è endemico nelle scimmie asiatiche ed è stato accidentalmente somministrato all'uomo con i vaccini antipolio contaminati da questo virus nel periodo 1955-1963. In anni recenti, sequenze genomiche di SV40 e la sua oncoproteina antigene T (agT) sono state rilevate in diverse neoplasie umane, come tumori cerebrali, mesoteliomi, linfomi ed osteosarcomi. Inoltre, SV40 è stato trovato associato al sangue periferico, sperma e urina di individui sani.

Metodi: Campioni di siero di pazienti HIV+ e HIV- e di individui sani, suddivisi per età e sesso, sono stati valutati con un test ELISA sperimentale per la ricerca di anticorpi anti-SV40. Antigeni di SV40, rappresentati da peptici sintetici, denominati peptidi B e C, sono stati selezionati perché non cross-reagiscono con altri antigeni di virus Polioma omologhi, come BK e JC, ubiquitari nella popolazione umana. Successivamente, i corrispondenti buffy coat di pazienti e donatori sani, scelti tra i campioni SV40-positivi in ELISA con densità ottica elevata, o nettamente SV40-negativi, sono stati sottoposti in cieco ad analisi di PCR per la ricerca di sequenze genomiche di SV40.

Risultati: Circa il 40% dei campioni di siero hanno mostrato la presenza di anticorpi anti-SV40. La SV40-positività e la SV40-negatività in ELISA è stata confermata dalla analisi di PCR. I nostri dati indicano che SV40 circola nella popolazione umana. Tuttavia la sua prevalenza appare di circa il 50% rispetto a quella dei virus Polioma umani BK e JC.

Conclusioni: La conferma della presenza di SV40 nella popolazione umana apre nuove prospettive di studio per comprenderne le vie di trasmissione e il suo potenziale coinvolgimento in patologie sia neoplastiche che non-neoplastiche.

Contributo: 20F.14

RISULTATI RECENTI

Pier Angelo Tovo* (*Università degli Studi di Torino*); Maurizio De Martino** (*Università degli Studi di Firenze*); Clara Gabiano (*); Luisa Galli (**)

Background: Il “Registro Italiano per l’infezione da HIV in età pediatrica”, istituito nel 1985, ha arruolato in questi vent’anni oltre 7000 bambini con infezione da HIV o nati da madre sieropositiva. Ciò ha permesso di valutare l’entità del fenomeno, la sua evoluzione nel tempo e di seguire prospetticamente gli effetti delle varie misure profilattiche e terapeutiche che si sono via via rese disponibili. Il Registro ha coinvolto 107 centri italiani.

Metodi: Al Registro vengono riportati, tramite apposite schede di segnalazione e follow-up, tutti i bambini con infezione o nati da madre HIV+, che giungono all’osservazione dei centri partecipanti. Attualmente è in corso l’aggiornamento annuale dei dati. Recentemente, le schede sono state parzialmente modificate: sono state richieste informazioni più dettagliate sulle terapie antiretrovirali della madre, sia prima che durante la gravidanza, nonché su eventuali periodi di interruzione. I dati aggiornati, le loro implicazioni pratiche e gli eventuali lavori scientifici vengono discussi durante la riunione annuale di tutti i Centri partecipanti.

Risultati: Ad oggi il numero totale di bambini inseriti nello studio è di 7176, la maggior parte (6966) sono nati da madre HIV+. Il tasso di trasmissione madre-bambino del virus è stato del 16,7% nei 1890 bambini nati prima del 1994, dell’8,4% per i 1047 nati tra il 1995 e il 1999 e si è ridotto al 2,02% per i 988 bambini nati a partire dal 2000. In bambini allattati artificialmente, nati per taglio cesareo elettivo e con terapia in gravidanza il tasso di trasmissione è risultato dell’1,8%. All’ultimo controllo i bambini con infezione perinatale da HIV erano 1353; di questi, 704 hanno sviluppato AIDS (52.03% degli infetti) e 406 sono deceduti (58.26% degli AIDS conclamati). Recentemente, è stata condotta un’analisi longitudinale sull’andamento dei valori di Ig in 234 bambini trattati con ≥ 3 farmaci. I bambini che nonostante la terapia sono andati incontro a fallimento immunologico avevano livelli basali di IgM z-scores più elevati ($P=0.042$) rispetto ai bambini responsivi. Dopo 3-12 mesi di terapia i livelli di IgA z-scores erano più elevati nei soggetti con fallimento immunologico ($P=0.043$) o virologico ($P<0.0001$). Tali risultati sono stati oggetto di un lavoro specifico in corso di stampa su Clin Exp Immunol. Abbiamo altresì condotto uno studio caso-controllo, paragonando i risultati ottenuti in 30 bambini a- o pauci-sintomatici trattati con ≥ 3 farmaci prima dei 6 mesi di età, con quelli di altri 30 soggetti che hanno iniziato ART dopo i 6 mesi. I bambini trattati precocemente hanno mostrato più frequentemente una carica virale indosabile (73.3% vs 33.3%; $P=0.004$); cariche virali significativamente inferiori a tutte le età; una più alta percentuale di CD4+, a 13-24 ($P=0.019$), 25-36 ($P=0.022$), e 37-48 (0.039) mesi di età; non hanno mai avuto una percentuale di CD4+ al di sotto del 15% durante l’intero follow-up; hanno avuto più basse percentuali di CD8+; non hanno presentato eventi clinici rilevanti. Lavoro inviato per la stampa ad AIDS.

Conclusioni: In conclusione, il tasso di trasmissione madre-bambino dell’HIV si è sensibilmente ridotto nel corso degli anni ed è attualmente dell’ordine del 2% nel nostro paese. Il dosaggio delle IgA sieriche può essere utilizzato quale indice di risposta alla terapia antiretrovirale in bambini infetti, qualora parametri più raffinati non siano disponibili. Infine, l’inizio precoce (nei primi 6 mesi di vita) della terapia combinata determina nel breve-medio periodo significativi benefici clinici, immunologici e virologici rispetto ad una terapia iniziata più tardivamente.

Contributo: 20F.15

REINFEZIONE SESSUALE DI HIV-1 IN COPPIE STABILI SIERO-CONCORDANTI PER HIV-1: RISCHIO DI TRASMISSIONE DI CEPPI CON RESISTENZA GENOTIPICA AGLI ANTIRETROVIRALI

Ubaldo Visco Comandini* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Giuseppina Liuzzi (*); Piercarlo Ceccotti (*); Giuseppe Pisani (*Ospedale S.Camillo, Roma*); Carlo Federico Perno (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Maria Capobianchi (*); Enrico Girardi (*)

Background: In Italia la gran parte degli infetti con HIV- 1, grazie alla attuale efficacia delle terapie antiretrovirali (ARV) è in grado di mantenere una normale vita lavorativa, sociale ed affettiva. Questo ha portato alla frequente formazione di coppie tra soggetti sieropositivi. Le linee guida, raccomandano l'uso del profilattico nei rapporti occasionali come strumenti di prevenzione, ma non forniscono raccomandazioni riguardo al suo utilizzo nelle coppie tra soggetti già sieropositivi. La possibilità di reinfezione, con un ceppo di HIV diverso da quello iniziale è stata documentata, specie con sottotipi differenti, ma frequenza e significato clinico di tale fenomeno restano sconosciuti. Nel compartimento genitale la bassa pressione farmacologica porta allo sviluppo di cloni resistenti, trasmissibili per via sessuale. È necessario indagare sulla loro reale possibilità di trasmissione e di conseguente fallimento virologico nel partner. Un modello di studio è rappresentato dalle coppie sessuali stabili sieroconcordanti per HIV. Obiettivo principale di questo nuovo progetto è quello di individuare i casi di reinfezione sessuale con quasispecie HIV ed in particolare analizzare l' impatto di eventuali reinfezioni con ceppi resistenti agli ARV sul fallimento virologico del partner. In secondo ordine studiare frequenza e modalità di trasmissione sessuale di altri virus (HCV, HPV) nelle coppie con infezione da HIV.

Metodi: Arruolare coppie stabili di pazienti HIV+ con rapporti sessuali regolari (omo- ed eterosessuali, numerosità prevista 60-80 coppie) in uno studio prospettico osservazionale (che non intende quindi modificare in alcun modo i comportamenti dei soggetti studiati). Le informazioni (storia clinica ed abitudini sessuali, eventuale utilizzo di droghe per via endovenosa, storia farmacologica antiretrovirale) verranno raccolte mediante un questionario somministrato ad inizio ed a fine studio. All'arruolamento ed al terzo anno verranno analizzate le sequenze di HIV env e pol (ed eventuali altri virus) su campioni di plasma, plasma seminale o secreto vaginale per caratterizzare la quasispecie prevalente in quel momento nel sangue e nel compartimento genitale, sia mutazioni archiviate nei PBMC, eventualmente anche mediante real-time PCR per specifiche mutazioni. I soggetti saranno poi seguiti secondo lo standard clinico. In occasione di inizio o fallimento virologico della terapia ARV o di sospensione della stessa (in uno dei due partner) i soggetti saranno valutati nuovamente (sia mediante questionario che con analisi molecolare virologica).

Risultati: È stato predisposto il sistema di raccolta e banking del materiale biologico. È stata preparato il questionario epidemiologico ed il data base per la raccolta delle informazioni. Il progetto ha ottenuto l'approvazione del Comitato Etico. Dall'aprile 2005 sono iniziati gli arruolamenti.

Conclusioni: La struttura dello studio dovrebbe fornire dati sufficienti per ipotizzare le dimensioni del fenomeno "reinfezione" in termini di incidenza e fattori di rischio associati, e valutare la possibilità di trasmissione di quasispecie resistenti. In caso di risultati negativi lo studio permetterà comunque di stabilire la non-rilevanza clinica del fenomeno. Le informazioni ottenute potrebbero fornire un contributo per adeguare il counseling e le raccomandazioni da fornire ai soggetti sieropositivi riguardo ai rapporti sessuali nell'era HAART.

Contributo: 20F.16

PREVALENZA ED EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI HTLV-1 IN IMMIGRATI HIV-POSITIVI E IN SOGGETTI VIVENTI IN PERU' E IN AFRICA OCCIDENTALE

Gianguglielmo Zehender* (*Istituto di Malattie Infettive e Tropicali, Università degli Studi di Milano*); Erika Ebranati (*); Chiara De Maddalena (*); Patricia Caballero (*National Health Institute di Lima (Perù)*); Flavia Bernini (*); Benedetta Massetto (*); Agostino Riva (*); Massimo Galli (*)

Background: HTLV-1 infetta circa 20 milioni di persone al mondo ed è l'agente eziologico di patologie linfoproliferative e neurologiche. Oltre che in Giappone, Melanesia, Caraibi che mostrano una sieroprevalenza del 5-25%, HTLV-1 è presente in altri paesi del Centro e del Sud America ed è endemico in Africa Sub-Sahariana. La presenza di HTLV-1 in Europa è essenzialmente dovuta alla sua importazione da regioni endemiche. In una nostra recente indagine su 393 immigrati in Italia (di cui 167 HIV-1 positivi), la prevalenza di HTLV-1 è risultata del 3.6% nel gruppo di pazienti HIV-1 positivi e dello 0.9% fra quelli HIV-1 negativi. La prevalenza più alta è stata osservata tra i soggetti provenienti dal Perù (17.6%) e dall'Africa Sub-Sahariana (1.4%).

Metodi: Abbiamo intrapreso la sorveglianza su HTLV-1 in 281 soggetti Peruviani (di cui 99 bambini), in larga prevalenza HIV-1 positivi, afferenti ad una casa famiglia di Lima e a 345 donne viventi in Guinea Bissau nell'Africa Occidentale (7.2% HIV positive) afferenti ad 11 centri di salute dislocati nel Paese. Lo studio di prevalenza di HTLV-1 è stato eseguito mediante screening con test ELISA utilizzando i campioni di sangue essiccati raccolti su Guthrie card. La caratterizzazione molecolare del sottotipo è stata eseguita mediante sequenziamento diretto e analisi filogenetica della regione LTR del genoma provirale.

Risultati: Nel gruppo dei soggetti residenti in Perù, 17 (9.3%) adulti, e nessuno dei bambini, sono risultati infetti da HTLV-1. La prevalenza di infezione è risultata massima tra gli HIV-1 positivi (10.3%), in particolare fra gli individui di sesso maschile. Nelle donne viventi in Guinea Bissau, la prevalenza di HTLV-1 è risultata del 2.6%. Stratificando rispetto al gruppo etnico sono state evidenziate differenze significative nella prevalenza dei virus analizzati; in particolare in alcune etnie la prevalenza media di HTLV-1 è risultata dell' 8%. L' analisi filogenetica è stata eseguita su 9 isolati HTLV-1 Peruviani e 8 della Guinea Bissau insieme a 7 isolati ottenuti da immigrati e 30 sequenze di riferimento dei diversi sottotipi. Tutti gli isolati di HTLV-1 Sud Americani sono risultati del tipo cosmopolita, sottogruppo transcontinentale (HTLV-1aA) mentre la caratterizzazione molecolare degli isolati della Guinea ha mostrato, la presenza del sottogruppo HTLV-1aD, tipico dell'Africa Settentrionale, insieme al sottotipo HTLV-1b originario dell'Africa Centrale.

Conclusioni: I nostri risultati mostrano una elevata prevalenza dell'infezione da HTLV-1 in Perù e in Guinea Bissau e suggeriscono l'esigenza di una attenta sorveglianza dell'infezione da HTLV-1 in soggetti immigrati provenienti da tali aree, considerando la possibilità di trasmissione del virus per via sessuale e tramite il sangue trasfuso, attualmente non sottoposto a screening per HTLV-1 nel nostro Paese. La contemporanea presenza in Guinea Bissau di ceppi di HTLV-1 tipici del Nord e del Centro Africa suggerisce un ruolo di crocevia di quest'area geografica nella circolazione dei diversi ceppi africani.

Contributo: 20F.17

Progetto
Eziopatogenesi
e studi immunologici e virologici dell'HIV/AIDS

Responsabili scientifici
Prof. Fernando AIUTI e Dr.ssa Barbara ENSOLI

INIBIZIONE DELLA REPLICAZIONE VIRALE DI HIV-1 E HTLV-2 DA PARTE DI CIITA, IL REGOLATORE TRASCRIZIONALE DELL'ESPRESSIONE DELL'HLA-II

Roberto Accolla* (*Dip. di Scienze Cliniche e Biologiche, Università dell'Insubria*); Giovanna Tosi (*) ; Elisabetta Pilotti** (*Dip. di Medicina Clinica, Nefrologia, e Prevenzione, Università degli Studi di Parma*); Andrea De Lerma Barbaro (*) ; Claudio Casoli (**); Antonio Toniolo (*)

Background: La comprensione dei meccanismi di interazione virus-cellula ospite è fondamentale per un approccio corretto di prevenzione e trattamento delle infezioni retrovirali. I nostri studi hanno dimostrato che CIITA, il regolatore trascrizionale dei geni HLA-II da noi scoperto, inibisce la replicazione di HIV-1 e di HTLV-2 competendo rispettivamente con i transattivatori virali Tat e Tax-2. L'obiettivo principale della nostra ricerca è decifrare i meccanismi molecolari attraverso cui CIITA inibisce l'azione dei transattivatori virali, in prospettiva di un utilizzo di CIITA per terapie alternative contro le infezioni da retrovirus. Il meccanismo di competizione di CIITA per Tat è stato in parte delineato e consiste nel legare la Ciclina T1 del complesso P-TEFb, rendendola quindi limitante per Tat nell'allungamento del trascritto virale. Per quanto riguarda l'inibizione di CIITA su Tax-2 non ne conosciamo ancora la base biochimica.

Metodi: Per identificare la regione di CIITA responsabile dell'inibizione dell'attività biologica dei transattivatori virali, un pannello di mutanti di delezione di CIITA è stato testato per la capacità di inibire, in saggi di cotrasfezione, l'azione transattivante di Tat e di Tax2 sul gene reporter della luciferasi sotto il controllo dell'LTR di HIV1 e di HTLV2, rispettivamente. Data l'analogia tra Tax-2 e Tax-1, abbiamo valutato se fattori cellulari utilizzati da Tax-1 e da CIITA per le proprie funzioni transattivanti influenzassero anche l'attività di Tax-2. Cellule B, CIITA-negative, trasfettate stabilmente con vettori di espressione per GFP-CIITA full length, 1-321 o 322-1130, sono state infettate con HTLV2 e testate per la capacità di supportare la replicazione virale.

Risultati: Abbiamo trovato che il frammento N-terminale 1-321 di CIITA inibisce l'azione transattivante sia di Tat che di Tax-2 sui rispettivi promotori. La sequenza minima di CIITA che inibisce Tat (CIITA 200-321) è però diversa da quella che inibisce Tax-2 (CIITA 64-200). Esperimenti di infezione con HTLV2 di cellule B esprimenti CIITA 1-321 o 322-1130, confermano che solo il frammento 1-321 inibisce potentemente la replicazione virale. Esperimenti analoghi sono in corso per l'infezione da HIV1 nelle cellule T. L'analisi di diversi fattori di trascrizione e fattori per il remodeling della cromatina, potenzialmente coinvolti nell'azione transattivante di Tax-2 sull'LTR, ha fornito nuove informazioni sulla biologia del virus HTLV-2 evidenziando alcune differenze rispetto a Tax-1 nell'utilizzo di tali coattivatori.

Conclusioni: CIITA inibisce la replicazione virale di HIV-1 competendo con la Ciclina T1 del complesso P-TEFb attraverso la sua regione N-terminale. Il meccanismo di inibizione di CIITA per HTLV-2, è diverso da quello di HIV-1 poiché diverse sono le sequenze di CIITA che mediano i due effetti. Questi dati ci fanno ben sperare che la modulazione dell'espressione e/o dell'utilizzo di CIITA nelle cellule infettate da HIV-1 e da HTLV-2 possa essere usata come strategia alternativa non solo per aumentare la risposta immunitaria contro il virus nei soggetti sieropositivi ma anche, e principalmente, per bloccare la replicazione virale e la diffusione dell'infezione.

Contributo: 40F.1

INTERAZIONE TRA NEF E PATHWAYS CELLULARI DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE NEI MACROFAGI

Giorgio Mangino* (*Dip. di Biologia, Università degli Studi di Roma Tre*); Zulema A. Percario (*); Gianna Fiorucci** (*CNR, Istituto di Biologia e Patologia Molecolare e Cellulare, Roma*); Eleonora Olivetta*** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Giovanna Romeo (**); Maurizio Federico (***); Elisabetta Affabris (*)

Background: La proteina virale Nef è espressa abbondantemente nelle fasi precoci dell'infezione con HIV e regola sia l'efficienza della replicazione virale che la patogenesi. Nef è un adattatore molecolare multifunzionale, che interagendo con numerose proteine cellulari down-regola il CD4 e antigeni MHC-I (HLA-A e -B), regola negativamente l'apoptosi nelle cellule infette, induce apoptosi in cellule by-stander, stimola l'efficienza dell'espressione provirale e provoca segnali di pre-attivazione della via di segnalazione del TCR. L'espressione di Nef nei macrofagi determina la produzione di fattori in grado di reclutare ed attivare linfociti T facilitandone l'infezione produttiva. Noi abbiamo descritto che la proteina Nef ricombinante, internalizzata da monocito-macrofagi primari umani determina una rapida regolazione dei trascritti con produzione di chemochine e citochine in grado di attivare in maniera autocrina e paracrina i trasduttori del segnale ed attivatori della trascrizione STAT1 e STAT3 (Federico *et al.*, *Blood* 2001, 98: 2752; Olivetta *et al.*, *J. Immunology* 2003, 170: 1716; Percario *et al.*, *J. Leukocyte Biology* 2003, 74: 821). La produzione Nef-indotta di fattori che portano all'attivazione di STAT1 e 3 si osserva anche a seguito di infezione a ciclo unico con HIV-1 pseudotipizzato con la proteina G del VSV. L'uso di mutanti di Nef ha evidenziato che questi effetti non richiedono il dominio proline-rich della proteina e l'attivazione delle chinasi src, bensì domini necessari per l'interazione con componenti cellulari coinvolti nel traffico di membrana. Il trattamento degli MDM con la proteina Nef determina anche l'attivazione di NF- κ B, fenomeno in corso di caratterizzazione.

Metodi: Per studiare la risposta al trattamento con la proteina Nef di colture primarie di macrofagi umani derivati da PBMC di donatori sani e di cellule della linea monocitaria umana THP-1 sono state effettuate analisi di espressione genica, di citofluorimetria, saggi ELISA, Western Blot e EMSA.

Risultati: Abbiamo osservato che l'attivazione di NF- κ B è rapida, cicloesimide-indipendente e precede l'incremento di fosforilazione di STAT1 e STAT3. Il trattamento con Nef determina inoltre la fosforilazione transitoria delle subunità alfa e beta del complesso chinasi IKK necessario per la degradazione degli inibitori del complesso NF- κ B e, parallelamente, l'attivazione delle vie di segnalazione delle MAPK chinasi (Jnk, Erk e p38). L'attivazione di NF- κ B e delle MAPK iniziano a partire da 15' di trattamento con un massimo a 30'-45'. Risultati ottenuti utilizzando il TPEN, un chelante dello zinco che interferisce con l'attivazione delle MAPK mediata da adattatori della famiglia TRAF (TNF Receptor Associated Factors), indicano un possibile coinvolgimento di questi adattatori nell'attivazione Nef-mediata di vie di segnalazione intracellulare. Parallelamente, per verificare se questi effetti rapidi indotti dal trattamento esogeno con Nef si osservino anche per espressione endogena stiamo cercando di mettere a punto un sistema di espressione inducibile della proteina nelle cellule THP-1.

Conclusioni: I risultati descritti, insieme ad analisi preliminari di espressione genica per microarray, suggeriscono che la proteina Nef durante il processo di internalizzazione in cellule monocito-macrofagiche induca fenomeni di segnalazione rapida che regolano l'espressione genica macrofagica e virale.

Contributo: 40F.2

STUDIO IMMUNOLOGICO NEL SANGUE E NEI LINFONODI IN SOGGETTI HIV POSITIVI CON NORMALE O DEFICITARIA RISPOSTA IMMUNOLOGICA ALLA TERAPIA ANTIVIRALE

Marco Marziali* (*Cattedra di Medicina Interna e Immunologia Clinica, Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Francesca Mazzetta (*); Rossella Carello (*); Wladimiro De Santis (*); Wilma Leti (*); Claudia Gramiccioni (*); Antonella Esposito (*); Ivano Mezzaroma (*); Caterina Fimiani (*); Fernando Aiuti (*)

Background: Scopo della HAART è sopprimere la replicazione di HIV e favorire la ricostituzione immunologica attraverso la moltiplicazione delle cellule "memoria" e il reclutamento dei precursori dagli organi linfoidi centrali. Dopo HAART si assiste in genere ad una immunoricostituzione parziale ed i linfociti CD4 raramente tornano a valori normali, in particolare se la terapia è iniziata in fase avanzata di malattia. Alcuni soggetti che rispondono alla terapia dal punto di vista virologico non mostrano alcun recupero dei CD4. Definiamo questi soggetti virological responders immunological non responders (VRINR). Scopo dello studio è valutare le caratteristiche immunologiche fenotipiche e funzionali dei VRINR rispetto a soggetti con adeguato recupero immunologico (immunological responder, IR).

Metodi: Abbiamo arruolato 35 pazienti HIV+, 21 in trattamento da almeno 4 anni con HIV-RNA non rilevabile da almeno 2, 14 naive per terapia. I 21 pazienti, omogenei per età, CD4 al baseline e anni di terapia, sono stati suddivisi in base all'incremento dei CD4 dopo 6 mesi di HAART; i soggetti con incremento <20% sono stati definiti VRINR (8 soggetti con CD4 al baseline 206 ± 75 cell/mmc, a 6 mesi 221 ± 74 cell/mmc, all'arruolamento 209 ± 75 cell/mmc), quelli con incremento >20% (13 con CD4 al baseline 146 ± 71 cell/mmc, a 6 mesi 315 ± 62 cell/mmc, all'arruolamento 500 ± 150 cell/mmc) sono stati definiti IR. I 14 pazienti naive per HAART avevano CD4 pari a 207 ± 127 cell/mmc e viremia di 4.79 ± 0.68 log₁₀; a 6 mesi di follow-up, presentavano un valore medio di CD4 di 502 ± 127 cell/mmc e viremia non rilevabile. Lo studio fenotipico e funzionale dei linfociti T è stato eseguito in citofluorimetria e CDR3 spectratyping; la produzione di IL-7 è stata valutata mediante ELISA.

Risultati: I dati preliminari sono relativi a 21 pazienti, 8 VRINR e 13 IR. I VRINR avevano una media di CD4 di 185 ± 74 vs 634 ± 300 cell/mmc degli IR, associata a ridotto numero di CD4 naive, CD4+/CD45RA+CD62L+, (43 ± 40 vs 302 ± 222 cell/mmc, $p < 0.01$). Abbiamo studiato l'espressione del CD31 sui linfociti CD4+CD45RA+, riscontrando nei VRINR una forte riduzione del subset CD4+/CD45RA+CD31+, che rappresenta il pool delle cellule naive timiche (32 ± 30 vs 235 ± 163 cell/mmc, $p < 0.01$). I VRINR avevano sui CD4 una maggiore espressione di Fas ($77 \pm 17\%$ vs $40 \pm 17\%$), HLADR ($18,5 \pm 3\%$ vs $10,2 \pm 5\%$) e CCR5 ($22 \pm 6\%$ vs $12 \pm 6\%$). È in corso lo studio delle cellule T regolatorie sui soggetti arruolati. L'analisi del repertorio BV del TCR in citofluorimetria ha mostrato nei VRINR un numero superiore di espansioni a carico dei CD4, dati che sembrano confermati dal profilo della CDR3 del TCR, che nei VRINR mostra una più elevata perturbazione delle famiglie BV nei CD4. I livelli sierici di IL-7 nei VRINR non erano significativamente diversi da quelli osservati nei controlli. È in corso lo studio dei suddetti parametri a livello dei linfonodi.

Conclusioni: Nei VRINR è stata osservata una riduzione significativa del compartimento naive, persistente dopo diversi anni dall'inizio dell'HAART, in parallelo ad aumentata espressione del Fas e dei markers di attivazione sui CD4, associata a ridotta diversità del repertorio BV del TCR rispetto agli IR. Lo studio in corso sui linfonodi di questi soggetti consentirà una migliore comprensione dei fenomeni patogenetici alla base della scarsa risposta immunologica alla HAART nei VRINR.

Contributo: 40F.3

PROPRIETÀ DI TAT: UN POTENZIALE COMPONENTE PER UN VACCINO ATTIVO CONTRO HIV

Laura Paleari* (*Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova*); Roberto Benelli (*) ; Douglas Noonan (*Università degli Studi dell' Insubria, Varese*); Ulrich Pfeffer (*) ; Davide Bisacchi (*) ; Adriana Albini (*)

Background: Tat extracellulare mostra un ampio spettro di attività che potrebbero promuovere l'infezione da HIV, includendo un'azione sui recettori per le chemochine per un forzoso/sostanziale reclutamento e parziale attivazione dei monociti e cellule dendritiche. Se da un lato queste attività possono contribuire alla diffusione dell'HIV, dall'altro sono in grado di rendere Tat un potente immunogeno. Abbiamo precedentemente dimostrato che Tat possiede delle regioni immunodominanti dopo immunizzazione nei topi (Tosi *et al.*, Eur J Immunol. 30: 1120-6, 2000). Similmente, l'analisi condotta su sieri da pazienti infetti con HIV e da volontari sani vaccinati con Tat inattivata ha dimostrato un pattern di immuno-dominanza simile (Noonan *et al.*, J Acquir Defic Syndr. 33: 47-55, 2003).

Metodi: Per l'identificazione di possibili geni bersaglio per Tat nei monociti, stiamo utilizzando i microarray e l'analisi di microarray confrontando monociti umani trattati e non-trattati e cellule di sarcoma di Kaposi (KS Imm). Le KS Imm sono state trattate con Tat o VEGF (0.01 μ M) per 5 ore. I monociti sono stati ottenuti da diversi donatori umani sani sia trattati che non trattati con Tat (0.1 μ M) per 16 hr. Ciascun campione di monociti è stato preventivamente saggiato per la sua capacità di risposta alla Tat controllando i flussi di ioni calcio. L'mRNA è stato estratto dai campioni e il relativo cDNA ottenuto con RT PCR. Il DNA è stato utilizzato per lo screening o dei microarray (ATLAS system) focalizzati su citokine o degli array di genoma umano U95Av2 Affymetrix GeneChip.

Risultati: Nei monociti, il segnale identificato più evidente era la chemochina MCP-1. L'aumento di espressione dell'mRNA della MCP-1 è stato anche confermato dalla PCR quantitativa. È interessante notare che l'mRNA di IL-8 e TNF α mostravano dei livelli stabili dopo trattamento con Tat. Tat era in grado di modulare un insieme limitato di geni nelle cellule KS Imm. Stiamo inoltre confrontando queste cellule con quelle modulate da VEGF utilizzando dei programmi di analisi SAM and Bioconductor 1.9.

Conclusioni: I nostri dati dimostrano che Tat extracellulare può "sovra-regolare" l'espressione del gene MCP-1 nei monociti, un ulteriore segnale infiammatorio che potrebbe, a sua volta, innescare il reclutamento dei monociti e l'immunogenicità. La Tat sembra avere degli effetti limitati su cellule KS Imm *in vitro*. Insieme, questi dati indicano che le proteine chimeriche con domini immunogenici e immunostimolatori specifici di Tat possono essere degli immunogeni efficienti e sicuri.

Contributo: 40F.4

IL B-OLIGOMERO DELLA TOSSINA DELLA PERTOSSE (PTX-B) PREVIENE L'INFEZIONE E LA REPLICAZIONE DI HIV IN TOPI HU-PBL-SCID ED È UN INIBITORE DELLA PROTEINA TAT

Chiara Rizzi* (*IRCCS S. Raffaele, Milano*); Marco Rusnati (*Università degli Studi di Brescia*); Caterina Lapenta** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Massimo Spada (**); Stefano Maria Santini (**); Filippo Belardelli (**); Guido Poli (*); Massimo Alfano (*)

Background: Il B-oligomero della tossina della pertosse (PTX-B) media il legame di PTX alle cellule bersaglio inducendo aumentati livelli di Ca²⁺ intracellulare. PTX-B è un mitogeno potenziante la risposta immunitaria, ed induce la maturazione funzionale di cellule dendritiche. Abbiamo dimostrato in precedenza che PTX-B inibisce l'infezione da ceppi R5 di HIV e la replicazione sia di virus R5 che X4 in cellule primarie e linee cellulari. Abbiamo quindi valutato la possibile interferenza di PTX-B in un sistema surrogato d'infezione *in vivo* da HIV (topi hu-PBL-SCID) e sugli effetti della proteina Tat.

Metodi: I topi hu-PBL-SCID (ricostituiti con PBL umani) sono stati inoculati i.p. con PTX-B e infettati i.p. con un ceppo R5 di HIV-1 (SF-162). Dopo 7 giorni, è stata valutata la capacità di ricostituzione dei tessuti linfoidi murini con PBL umani sia in animali non trattati che trattati con PTX-B. Sono stati quindi misurati i livelli di DNA virale nei PBL umani recuperati dai tessuti linfoidi e la viremia plasmatica, nonché la capacità di produrre virus infettante dai PBL recuperati dalla cavità peritoneale mediante cocoltura con altri PBL. L'effetto anti-Tat di PTX-B è stato valutato in cellule epiteliali HL3T1 ed in cellule cronicamente infettate da HIV (U1) rispetto a GST-Tat extracellulare o di un plasmide esprimente Tat. L'effetto di PTX-B è stato valutato tramite la misura dell'espressione di LTR-CAT in cellule HL3T1 e di attività RT nonché di secrezione di IL-8 in cellule U1.

Risultati: Il trattamento dei topi hu-PBL-SCID con PTX-B (50 ng/topo) 2 h prima dell'infezione, ripetuto 3 e 6 giorni dopo, ha prevenuto l'infezione e replicazione virale in tutti gli animali testati (n=10), come evidenziato dall'assenza di viremia, di DNA virale nei linfonodi murini ricostituiti con cellule umane (HLA+), e di replicazione virale *ex vivo* mediante cocoltura. Una singola iniezione di PTX-B (50 ng/topo) 2 h prima dell'infezione, oppure 3 o 6 giorni dopo l'infezione, non ha diminuito i livelli d'infezione dei PBL umani presenti nei tessuti linfoidi murini o nella cavità peritoneale, ma ha statisticamente diminuito i livelli di viremia plasmatica (C. Lapenta *et al.*, *International Immunology*, 2005). Abbiamo quindi dimostrato che PTX-B non inibisce il legame ed il processo d'internalizzazione di GST-Tat in cellule epiteliali HL3T1, ma inibisce la capacità di Tat di indurre attivazione di NF-KB e la transattivazione di HIV-LTR. Infine, PTX-B inibisce l'espressione di HIV e di IL-8 in cellule U1 stimulate con Tat, sia extracellulare che Tat trasfettato come DNA. Gli effetti anti-Tat di PTX-B sono stati riprodotti col mutante geneticamente modificato della tossina della pertosse, PT-9K/129G, che ritiene tutte le caratteristiche strutturali e di funzionalità del PTX-B e che è stato precedentemente utilizzato come vaccino contro l'infezione da *B. pertussis* (C. Rizzi *et al.*, *Eur. J. Imm.* 34:530, 2004).

Conclusioni: Nel 2004 abbiamo definito nuovi aspetti della capacità di PTX-B d'inibire l'infezione e la replicazione di HIV, identificando un'attività anti-Tat, una dose ed un protocollo di trattamento efficace nella prevenzione dell'infezione *in vivo* in topi hu-PBL-SCID. Questi risultati rinforzano l'ipotesi che PTX-B sia potenzialmente un nuovo agente farmacologico anti-HIV.

Contributo: 40F.5

STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEI RECETTORI PER CHEMOCINE NELLA PATOLOGIA LINFOPROLIFERATIVA EBV-ASSOCIATA DEL TOPO HU/SCID: IMPLICAZIONI PER L'ASSE CXCL12/CXCR4 NEL PROCESSO DI LINFOMAGENESI

Erich Piovan* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Stefano Indraccolo (*); Valeria Tosello (*); Rita Zamarchi (*); Sonia Minuzzo (*); Lidia Moserle (*); Alberto Amadori (*)

Background: Studi epidemiologici condotti negli ultimi anni hanno evidenziato un'incidenza di linfomi di tipo B non-Hodgkin nei soggetti immunodepressi da 20 a 50 volte superiore rispetto alla popolazione normale. In questo ambito, la deregolazione della funzione linfocitaria B in corso di infezione da HIV e i riflessi che essa ha sul processo di linfomagenesi tipico di questi pazienti rappresenta un campo di ricerca di notevole interesse. In questo studio abbiamo approfondito ulteriormente i meccanismi alla base di tale fenomeno, con particolare riferimento al contributo fornito dai linfociti T nel favorire il processo di linfomagenesi nell'ospite immunocompromesso. Il modello di linfomagenesi umana nel topo SCID inoculato per via intra-peritoneale con linfociti di sangue periferico da donatori EBV+, rappresenta un modello per studiare la linfomagenesi EBV-correlata nell'ospite immunocompromesso. Tali animali infatti sviluppano dei linfomi B EBV+ che assomigliano alla patologia linfoproliferativa post-trapianto dell'uomo. Recenti studi hanno dimostrato che in questo modello la presenza di linfociti T nell'inoculo cellulare è necessaria per lo sviluppo di linfoma. Dato il ruolo emergente delle chemochine e dei loro recettori, nonché il loro massiccio coinvolgimento in una vasta gamma di processi biologici quali la proliferazione cellulare, l'apoptosi, la sopravvivenza cellulare, l'angiogenesi e l'infezione da HIV-1 ed HHV-8, si potrebbe ipotizzare che l'azione promuovente la linfomagenesi esercitata dai linfociti T sia in parte legata alla produzione di chemochine attive sui linfociti B trasformati da EBV. Abbiamo quindi voluto affrontare il ruolo del sistema delle chemochine nella linfomagenesi EBV-correlata nel modello del topo SCID.

Metodi: I linfomi hu/SCID sono stati caratterizzati tramite analisi citofluorimetrica per l'espressione dei recettori per chemochine CCR1-CCR7 e CXCR1-CXCR5. Inoltre, è stata valutata l'espressione di CXCL12 nelle cellule trasformate da EBV. Si è quindi proceduto a valutare il potenziale ruolo dell'asse CXCL12/CXCR4 in questo modello sperimentale sia *in vitro* attraverso test di chemotassi, chemoinvasione, adesione e proliferazione, sia *in vivo* per mezzo di esperimenti di neutralizzazione.

Risultati: Il recettore CXCR4 è risultato essere tra i recettori maggiormente espressi; inoltre l'espressione di superficie di CXCR4 era prevalentemente limitata ad una sottopopolazione tumorale esprimente CD23 a bassi livelli, mentre il ligando di CXCR4, CXCL12, era espresso prevalentemente dalla sottopopolazione tumorale esprimente CD23 ad alti livelli. La neutralizzazione *in vitro* dell'asse autocrino/paracrino CXCL12/CXCR4 era in grado di inibire significativamente sia la proliferazione che la sopravvivenza delle cellule di linfoma. Inoltre, la proteina CXCL12 era espressa precocemente dalle cellule recuperate dalla cavità peritoneale in seguito all'inoculo cellulare e dalle cellule B trasformate da EBV, ma non dai linfociti B naive o attivati; in aggiunta, il processo di linfomagenesi si associava ad un drammatico incremento dei livelli di CXCL12 murino all'interno della cavità peritoneale. Infine, la neutralizzazione *in vivo* dell'asse CXCL12/CXCR4 era in grado di inibire significativamente la crescita tumorale.

Conclusioni: Questo studio dimostra come l'infezione da EBV possa determinare l'espressione di CXCL12 nei linfociti B e suggerisce il possibile coinvolgimento dell'asse CXCR4/CXCL12 nel processo di linfomagenesi EBV-associato nell'ospite immunodeficiente.

Contributo: 40F.6

DEFINIZIONE DELLE CARATTERISTICHE BIOLOGICHE (SI-X4 O NSI-R5) DI HIV-1 MEDIANTE SEQUENZIAMENTO DEL V3 IN PAZIENTI CON VARIA ESPOSIZIONE E RISPOSTA AL TRATTAMENTO

Annalisa Saracino* (*Università degli Studi di Foggia*); Grazia Punzi** (*Università degli Studi di Bari*); Marianna Marangi (*) ; Antonella Lagioia (**); Gioacchino Angarano (*)

Background: La possibilità di classificare gli isolati virali come SI (X4) o NSI (R5) è importante per la prognosi della infezione. Le metodologie di isolamento e caratterizzazione degli isolati primari su linee cellulari sono complesse, lunghe, costose e richiedono un laboratorio P3. Ciò ha limitato l'uso del fenotipo virale quale marcatore di progressione nella pratica clinica e nella gestione dei pazienti in terapia nei quali non sempre l'isolamento virale ha successo. Il maggiore determinante del fenotipo di HIV-1 risiede nella terza regione variabile della gp 120 (V3). In particolare la presenza di almeno una sostituzione basica nelle posizioni 11 o 25 del V3 è stata associata con il fenotipo SI. Al fine di chiarire se un approccio molecolare può fornire informazioni utili in tutti quei casi in cui è difficile ottenere una coltura positiva, su una casistica di pazienti con varia esposizione e risposta al trattamento, abbiamo voluto verificare il grado di concordanza tra fenotipizzazione tradizionale e analisi di sequenza del V3 nel definire ceppi SI/NSI.

Metodi: In 12 pazienti naive alla terapia antiretrovirale e 34 in trattamento HAART, 26 dei quali in fallimento (pVL >50 cp/ml), l'isolamento di HIV-1 è stato effettuato mediante co-coltura linfocitaria; il sovrantante della prima coltura con un valore positivo di p24 è stato utilizzato per infettare la linea cellulare MT-2 e valutare l'induzione di effetto citopatico. L'analisi di sequenza con valutazione della composizione aminoacidica nelle posizioni 11 e 25 del V3 ed attribuzione di un "genotipo 11/25" alle sequenze con residui carichi positivamente (H/K/R) (sequenza di tipo "si" in contrapposizione alle sequenze di tipo "nsi") è stata condotta previa amplificazione e successivo sequenziamento diretto con l'uso dei primers V3O2F, V3O2R, V3I2F, V3I2R. Lo studio di sequenza è stato condotto sia su DNA provirale da PBMCs che su RNA dei sovrantanti culturali. È stata quindi verificata la corrispondenza tra "fenotipo SI/NSI" e "definizione si/nsi" della sequenza del V3.

Risultati: L'isolamento era positivo nel 78% dei pazienti naive, nel 69% dei falliti ed in nessuno dei pazienti con risposta virologica alla terapia. Un ceppo di tipo SI era caratterizzato nel 27% sia dei pazienti naive che dei falliti. Una più bassa conta di CD4+ ed una più elevata pVL erano associate alla possibilità di ottenere un isolato positivo e un ceppo SI nei pazienti naive e nei falliti. In 8/8 naive con un ceppo NSI *in vitro*, l'analisi del V3 era predittiva di un virus NSI. In 2/3 pazienti con un ceppo SI *in vitro*, l'analisi del V3 confermava la presenza di un genotipo 11/25. Nei 13 pazienti falliti con un ceppo NSI *in vitro*, l'analisi del V3 loop confermava un genotipo "nsi". In 4/5 pazienti con un ceppo SI *in vitro*, l'analisi del V3 confermava la presenza di un genotipo 11/25. Nei pazienti con risposta virologica alla terapia, dai quali non era stato possibile ottenere un isolato, l'analisi del V3 dimostrava un genotipo 11/25 (si) in 1/8 ed un genotipo "nsi" nei rimanenti 7 pazienti. Complessivamente, l'analisi del V3 concordava con il fenotipo ottenuto *in vitro* nel 93% dei casi.

Conclusioni: L'analisi di sequenza del V3 può fornire informazioni utili in tutti quei casi in cui è difficile ottenere una coltura positiva. Lo studio di follow-up dei pazienti falliti inseriti in un nuovo programma di trattamento consentirà di valutare l'eventuale associazione tra fenotipo e risposta terapeutica.

Contributo: 40F.7

L'INDUZIONE DI APOPTOSI NEI MACROFAGI UMANI È MEDIATA DA CEPPI X4, E NON R5, DI HIV-1

Stefano Aquaro* (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Alessandro Ranazzi (*); Maria Concetta Bellocchi (*); Dominique Schols (*Rega Institute di Lovanio, Belgio*); Michela Pollicita (*); Fabiola Di Santo (*); Raffaele Calìo (*); Carlo Federico Perno (*)

Background: È universalmente accettato che i principali corettori di HIV-1 sono il CXCR4 (X4) ed il CCR5 (R5). La condizione di eterozigote R5 delta32 favorisce la non progressione di malattia, come nei long term non-progressor (LTNP), e previene l'encefalite da HIV (HIVE). Il legame di HIV-1 con il corettore X4 è associato ad una serie di risposte funzionali, inclusa l'induzione di apoptosi, nelle differenti cellule bersaglio del virus. Il ruolo di X4 ed R5 è ancora poco noto nell'infezione dei monociti-macrofagi (M/M), che sono un reservoir cruciale di HIV-1. I M/M esprimono sia X4 che R5, ma l'infezione produttiva è stata osservata esclusivamente con ceppi di HIV-1 che usano R5 (ceppi R5) come corettore.

Metodi: I M/M sono stati ottenuti da linfomonociti del sangue periferico di donatori volontari sani ed infettati *in vitro* con diversi ceppi X4, R5 e X4/R5 di HIV-1 sia adattati in laboratorio sia isolati clinici. La produzione di HIV p24 gag Ag è stata misurata nei sovranatanti delle colture cellulari in tempi differenti. La frammentazione del DNA (apoptosi) è stata calcolata attraverso analisi al FACS. L'attivazione genica è stata determinata tramite metodica di microarray e l'attivazione delle MAPK per mezzo di western blotting.

Risultati: Una produzione virale stabile ed elevata è stata ottenuta infettando i M/M con ceppi R5, mentre con ceppi X4 si è ottenuta un'infezione abortiva. I ceppi X4 hanno tutti indotto apoptosi nei M/M con un picco >50% ($p < 0.001$) al giorno 10 dopo l'infezione (*in vitro* solo il 50-60% dei M/M è infettato). Di contro, allo stesso tempo, l'apoptosi nei M/M non infettati o infettati con ceppi R5 è stata di 4.2% e 4.1%, rispettivamente. Tutti i ceppi X4, ma non i ceppi R5, hanno indotto l'attivazione di p38 MAPK e Erk2 MAPK a 10' e 30' dopo l'infezione. Sia l'apoptosi sia l'attivazione delle MAPK sono state inibite completamente da AMD3100 (potente inibitore antagonista di X4). I ceppi X4/R5 hanno mostrato un comportamento intermedio nell'induzione di apoptosi (aumentata in presenza di TAK-779, inibitore specifico di R5; completamente abolita da AMD3100). L'analisi al microarray ha evidenziato che i ceppi X4 attivano nei M/M geni pro-apoptotici e modulano l'espressione di oncogeni a 24 ore dall'infezione. Viceversa, i ceppi R5 non modulano l'espressione di questi geni.

Conclusioni: I risultati ottenuti gettano nuova luce sui meccanismi biologici legati al fenomeno di sopravvivenza cellulare dei M/M durante l'infezione da HIV-1. L'apoptosi dei M/M dopo infezione con ceppi X4 e la conseguente deplezione di questi virus dai reservoir produttivamente infettati, può spiegare il rilevante ruolo di R5 e dei ceppi R5 di HIV-1 in tutte le fasi della infezione.

Contributo: 40F.8

MATURAZIONE DELLE CELLULE DENDRITICHE MONOCITARIE UMANE (MDDC) INDOTTA DA PRODOTTI MICROBICI È CARATTERIZZATA DALL'INDUZIONE DI CD38 IMPLICATO NELLE FUNZIONI SIA DELLE MDDC CHE DEL HIV-1

Giorgio Fedele* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Loredana Frasca (*); Fabiana Spensieri (*); Raffaella Palazzo (*); Fabio Malavasi (*Università degli Studi di Torino*); Emanuele Fanales Belasio (*); Clara Maria Ausiello (*)

Background: È ormai chiaro che alcuni patogeni, direttamente o attraverso sostanze prodotte, sono in grado di sovvertire le funzioni delle cellule dendritiche (DC). La proposta di ricerca è volta a individuare prodotti di origine microbica in grado di interferire con le funzioni delle DC favorendo o meno la patogenicità del virus dell'immunodeficienza acquisita di tipo 1 (HIV-1). Obiettivo finale è l'individuazione di una strategia che porti a una risposta immune protettiva contro l'infezione da HIV-1. Abbiamo studiato la capacità di lipopolisaccaride (LPS) derivati da *E. coli* e da *B. pertussis* di influenzare le attività funzionali delle DC coinvolte nell'interazione con HIV-1 e con proteine virali quali TAT. È noto che la tossina della pertosse (PT) è in grado di inibire l'ingresso del virus deattivando il CCR5 in cellule T attivate e riduce i processi virali Tat dipendenti. A questo proposito abbiamo dimostrato la capacità della PT di agire in sinergia con LPS nell'induzione di elevati livelli di IL-12 in mDC e di promuovere una forte polarizzazione Th1 della risposte immune naturale e T specifica. L'azione di questi prodotti microbici è stata valutata nella modulazione di recettori presenti sulle DC già noti per il loro coinvolgimento nella patologia AIDS, quali il CD38 una molecola che è stata da noi individuata come un nuovo marcatore della fase matura delle DC.

Metodi: La maturazione fenotipica delle DC è stata studiata utilizzando tecniche di citometria a flusso. La presentazione allo-antigenica è stata studiata mediante test di proliferazione. La polarizzazione della risposta T è stata studiata attraverso la produzione di citochine usando kit ELISA e tecniche di marcatura intracellulare.

Risultati: Abbiamo caratterizzato la modulazione del CD38 su mMDDC in funzione dello stato maturativo indotto dai due LPS e dalla PT. Sono in corso gli studi riguardanti le pDC. Sono in corso gli studi di polarizzazione della risposta T per valutare come i prodotti microbici, in associazione alla proteina TAT di HIV-1, promuovono la maturazione di mMDDC, e in particolare l'espressione di CD38, e possano influenzare la risposta T. Per l'identificazione di strategie atte a bloccare e/o potenziare interazione fra prodotti microbici, abbiamo dimostrato come il blocco del segnale via CD38 inibisce diverse funzioni delle DC quali l'espressione del marcatore CD83, la produzione di IL-12 e la presentazione antigenica, e alteri la polarizzazione T indotta dalle mMDDC maturate dai prodotti microbici in studio. È iniziata la messa a punto di metodiche atte allo studio della funzionalità di mDC e pDC in presenza dei prodotti microbici e di proteine di HIV direttamente dal sangue periferico. Tale attività è propedeutica per l'applicazione di questi approcci sperimentali ai pazienti AIDS nei diversi stadi della malattia.

Conclusioni: Questi studi iniziali hanno evidenziato capacità differenziali di prodotti microbici quali LPS di diverse specie batteriche e la PT di indurre il marker di maturazione CD38, già implicato nei processi patologici coinvolti nell'AIDS. Tali risultati ci spingono ad approfondire la capacità delle DC di promuovere o ostacolare l'infezione di HIV-1 e in particolare il ruolo di questo marcatore nella regolazione della risposta immune. Abbiamo infatti dimostrato che l'espressione di CD38 nelle DC è responsabile della presentazione antigenica e della produzione di citochine regolatorie Th-1, particolarmente coinvolta nella patogenesi dell'AIDS.

Contributo: 40F/A

CONCENTRAZIONI PICOMOLARI DI PROTEINA HIV-1 TAT ENTRANO SELETTIVAMENTE IN CELLULE DENDRITICHE ED ENDOTELIALI ATTIVATE

Giovanni Barillari (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Emanuele Fanales Belasio* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Cecilia Sgadari (*); Clelia Palladino (*); Sonia Moretti (*); Barbara Ensoli (*)

Background: Concentrazioni micromolari di proteina HIV-1 Tat entrano in una grande varietà di tipi cellulari, promuovendo l'espressione di geni cellulari e/o dell'HIV-1 (Barillari G and Ensoli B. Clin. Microb. Rev. 15: 310, 2002). In un precedente studio abbiamo visto come le cellule dendritiche (DC) adsorbano, attraverso un meccanismo energia-dipendente non ancora definito, anche quantità picomolari di Tat, che sono incapaci di attivare l'espressione genica (Fanales-Belasio E, *et al.* J. Immunol. 168: 197, 2002). Sappiamo inoltre che, nelle lesioni di sarcoma di Kaposi (KS) associato all'AIDS, Tat è presente a livello dei vasi, all'interno delle cellule endoteliali (EC) (Barillari and Ensoli 2002). Il fatto che le EC non siano infettate dall'HIV-1 ha suggerito che queste cellule possono adsorbire la Tat rilasciata dai linfociti infetti infiltranti le lesioni KS. Infatti, nostri dati preliminari indicano come bassi quantitativi di Tat entrino nelle EC attivate da quei mediatori flogistici che sono espressi nelle lesioni KS. Scopo di questa ricerca sarà identificare i meccanismi alla base della proprietà che concentrazioni picomolari di Tat hanno di penetrare selettivamente in DC ed EC attivate.

Metodi: EC della vena ombelicale umana (HUVEC), attivate o meno da citochine infiammatorie (Barillari and Ensoli 2002), e DC derivate da monociti umani (Fanales-Belasio 2002) sono state esposte per vari tempi a concentrazioni scalari di proteina Tat ricombinante. La presenza di Tat all'interno di DC ed EC è stata evidenziata mediante anticorpi anti-Tat e citometria a flusso. In altri esperimenti le EC sono state esposte a Tat marcato con rodamina, la cui entrata e distribuzione intracellulare è stata osservata al microscopio a fluorescenza.

Risultati: Come visto per le DC, Tat entra nelle EC in modo dose- e tempo-dipendente. Concentrazioni picomolari di Tat entrano in pochi minuti in EC attivate dalle citochine infiammatorie, ma non in EC non trattate con citochine infiammatorie. Quantità micromolari di Tat entrano sia nelle EC attivate che in quelle non attivate. Dosi picomolari di Tat entrano nelle DC ma non nei linfociti. Infine, diversamente da quanto osservabile con alte dosi di Tat, l'entrata di concentrazioni picomolari di Tat in DC ed EC attivate è abolita dall'ossidazione della proteina e da basse temperature.

Conclusioni: Concentrazioni picomolari, non transattivanti, di Tat entrano selettivamente in EC attivate e DC. In entrambi questi tipi cellulari, l'entrata di dosi picomolari di Tat è energia-dipendente e richiede Tat nativa e bio-attiva. Chiarire i meccanismi alla base di questo evento potrebbe fornire informazioni utilizzabili per veicolare, tramite Tat o suoi frammenti, farmaci a DC ed EC reclutate ed attivate in tessuti sede d'infiammazione e/o neoplasia.

Contributo: 40F.9

LA CROSS-PRESENTAZIONE DI ANTIGENI VIRALI SOLUBILI È FAVORITA DALLA INIBIZIONE DEL “PROCESSING” A LIVELLO DEGLI “EARLY ENDOSOMES: IMPLICAZIONI PER L’ALLESTIMENTO DI VACCINI CHE GENERANO RISPOSTE DI LINFOCITI T CD8

Daniele Accapezzato* (Fondazione Andrea Cesalpino, Dip. di Medicina Interna, Università degli Studi di Roma “La Sapienza”); Vincenzo Visco** (Dip. di Medicina Sperimentale e Patologia, Università degli Studi di Roma “La Sapienza”); Vittorio Francavilla (*); Maria Rosaria Torrisi (**); Vincenzo Barnaba (*)

Background: Il fenomeno della cross-presentazione è generalmente un requisito delle cellule dendritiche (DC), che sono capaci di fagocitare antigeni esogeni, e di presentarli sulle molecole MHC di I classe a linfociti T CD8. Tale fenomeno sembra essere critico per indurre sia tolleranza, sia priming di linfociti T CD8 autoreattivi. Il sistema di cross-presentazione inoltre sembra unico per indurre risposte di linfociti T CD8 antivirali contro antigeni esogeni derivati da virus che non infettano le DC o ne inibiscono le funzioni stimolatorie (come accade per l’HIV). Scopo del nostro lavoro è stato quello di identificare strategie capaci di favorire la cross-presentazione di antigeni solubili e quindi potenzialmente utilizzabili per disegnare nuovi vaccini anti-HIV.

Metodi: A. Esperimenti di cross-presentazione *in vitro* ed *ex vivo* di antigeni virali solubili (come Nef) da parte di DC a linfociti T CD8, ed inibizione del processing endocitico;

B. Visualizzazione al m. confocale e analisi biochimiche (Western Immunoblot) del trasporto di antigeni solubili dagli endosomi al cytosol di DC, in seguito a inibizione del processing endocitico;

C. Esperimenti di fagocitosid. Purificazione di frazioni endocitiche e citosoliche da DC e susseguente analisi dell’incrementato trasporto nel cytosol di antigeni solubili virali.

Risultati: Abbiamo dimostrato:

a – l’inibizione del processing endocitico delle DC incrementa la cross-presentazione di antigeni virali solubili a linfociti T CD8 antigene-specifici;

b – l’inibizione del processing endocitico favorisce il trasporto degli antigeni solubili dagli endosomi al cytosol, come visualizzato al confocale

c – l’inibizione del processing endocitico favorisce il trasporto degli antigeni solubili dagli endosomi al cytosol, come dimostrato con esperimenti di WB su frazioni endocitiche e citosoliche da DC previamente pulstate con antigeni solubili

d - APC inibite per la via di processazione endocitica e che presentano antigeni virali solubili inducono *ex vivo* risposte di linfociti T CD8 antivirali derivate da PBMC fresche di pazienti con infezione da HIV o HCV.

Conclusioni: Le nostre osservazioni hanno importanti implicazioni sia in fisiologia sia in patologia. Il successo di vaccini innovativi anti-HIV potrebbe ricevere un decisivo supporto dell’incremento della cross-presentazione di antigeni solubili allo scopo di indurre risposte CD8 protettive. In genere, i vaccini convenzionali usati nell’uomo sono costituiti da proteine solubili che inducono risposte CD4 e non CD8. La nostra evidenza che l’inibizione del compartimento endocitico incrementa la cross-presentazione di antigeni solubili suggerisce che tale strategia potrebbe essere usata per l’allestimento di vaccini anti-HIV innovativi che generino potenti risposte di linfociti T CD8.

Contributo: 40F.10

LA PROTEINA TAT DELL'HIV INDUCE MUTAZIONI CROMOSOMICHE INTERFERENDO CON IL PROCESSO MITOTICO

Piero Augusto Battaglia* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Donatella Ponti** (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Valeria Naim (**); Serenella Venanzi (*); Rossana Psaila (*); Franca Gigliani (**)

Background: La proteina Tat dell'HIV altera numerose funzioni cellulari inducendo angiogenesi, proliferazione cellulare e apoptosi e alterando la risposta immunitaria dell'ospite. Inoltre Tat è implicata nelle malattie neurodegenerative associate all'AIDS e nei processi di oncogenesi. Il meccanismo mediante il quale Tat altera le diverse funzioni cellulari è ancora largamente sconosciuto. Il nostro gruppo, usando un ceppo di *Drosophila melanogaster* (costruito da noi) come modello animale, ha dimostrato che la proteina Tat interagisce con la tubulina e che l'effetto di questa interazione ritarda la velocità di polimerizzazione della tubulina (Battaglia *et al.*, 2001 *J. Cell. Sci.*). Dato che la tubulina è il principale componente del fuso mitotico, una alterazione della sua polimerizzazione dovrebbe causare, come conseguenza, una alterazione della mitosi. In questo lavoro noi abbiamo analizzato gli effetti della interazione Tat-tubulina usando il ceppo di *Drosophila* transgenico per il gene *tat* la cui espressione è sotto il controllo di un promotore heat shock.

Metodi: Per analizzare gli effetti dell'interazione di Tat con la tubulina, noi abbiamo iniettato la proteina Tat purificata negli embrioni di *Drosophila* allo stadio di blastoderma sinciziale ed esaminato *in vivo* mediante microscopia confocale le divisioni mitotiche dell'embrione misurando il tempo delle varie fasi dei cicli nucleari, analizzato l'allineamento e il tempo di permanenza dei cromosomi alla piastra equatoriale e il cariotipo delle *Drosophila* che esprimevano la proteina Tat utilizzando le cellule dei cervelli di larve transgeniche per *tat*.

Risultati: Per analizzare le conseguenze della interazione di Tat con la tubulina sul processo mitotico, abbiamo iniettato la proteina Tat purificata negli embrioni di *Drosophila* allo stadio sinciziale. In seguito all'iniezione di Tat, viene alterato il timing dei cicli nucleari e più precisamente viene allungato il periodo tra la rottura della membrana nucleare e l'inizio dell'anafase e quello compreso tra l'inizio dell'anafase e la successiva formazione dell'involucro nucleare. Questi due periodi corrispondono rispettivamente all'allineamento dei cinetocori e all'uscita dalla mitosi. Noi abbiamo dimostrato che questi due ritardi sono la conseguenza di specifici danni indotti da Tat sull'allineamento dei cinetocori e sul tempo della segregazione dei cromatidi all'anafase. Abbiamo inoltre dimostrato che l'espressione di Tat nelle cellule del cervello delle larve di *Drosophila*, produce una percentuale significativa di cellule poliploidi ed aneuploidi.

Conclusioni: In conclusione, i risultati ottenuti in questo lavoro dimostrano che Tat altera il processo mitotico attraverso l'interazione con la tubulina, e suggeriscono che in seguito alla presenza di Tat, vengano attivati due specifici checkpoints del fuso mitotico. Dato che la tubulina (con cui Tat interagisce) e gli eventi molecolari (alterati da Tat) sono altamente conservati dagli invertebrati all'uomo, è altamente probabile che Tat interferisca con il processo mitotico anche nelle cellule umane infettate dall'HIV. Questi risultati aumentano le nostre conoscenze sul meccanismo molecolare che sta alla base dell'insorgenza dei tumori associati all'AIDS.

Contributo: 40F/B

IRF-1 LEGA LA REGIONE ENHANCER DELL'LTR DI HIV-1 IN UN COMPLESSO TRASCRIZIONALMENTE ATTIVO CON NF-KB

Marco Sgarbanti* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Anna Lisa Remoli (*); Giulia Marsili (*); Alessandra Borsetti (*); Barbara Ridolfi (*); Edvige Perrotti (*); Ramona Ilari (*); Roberto Orsatti (*); Emilia Stellacci (*); Barbara Ensoli (*); Angela Battistini (*)

Background: L'espressione genica del virus HIV-1 ed i meccanismi patogenetici che determinano lo sviluppo dell'infezione e delle patologie ad essa associate, dipendono in larga misura dall'interazione tra fattori cellulari e virali. Queste interazioni determinano infatti sia i livelli di espressione virale nei diversi tessuti che la capacità del virus di modificare la fisiologia cellulare e quindi la risposta immune. Tra i fattori cellulari coinvolti nella trascrizione del genoma di HIV-1, NF-kB gioca un ruolo essenziale ed è precocemente attivato dall'infezione virale. In maniera analoga abbiamo precedentemente dimostrato che un fattore di trascrizione cellulare appartenente alla famiglia IRF (Interferon Regulatory Factor), IRF-1 viene indotto precocemente dall'infezione virale prima della espressione del trasattivatore virale Tat, ed è in grado di stimolare la trascrizione dell'LTR anche in assenza di Tat. NF-kB ed IRF-1 hanno siti di legame specifici sul promotore virale. In particolare NF-kB lega ad alta affinità la regione enhancer a circa 100bp dal sito di inizio della trascrizione, mentre una sequenza ISRE posta a valle del sito d'inizio della trascrizione lega alcuni fattori della famiglia IRF. Entrambe le sequenze sono critiche per un'efficiente trascrizione ed una replicazione ottimale del virus. Abbiamo osservato che la stimolazione dovuta ad IRF-1 non è mediata esclusivamente dalla sequenza ISRE. Lo scopo del nostro studio è pertanto quello di definire le sequenze attraverso cui IRF-1 è in grado di stimolare la trascrizione dell'LTR in aggiunta alla sua sequenza consensus e considerato che su molti promotori cellulari IRF-1 ed NF-kB cooperano nell'indurre la trascrizione, verificare se i due fattori siano in grado di cooperare anche nella stimolazione dell'LTR.

Metodi: L'interazione funzionale fra IRF-1 ed NF-kB è stata determinata in saggi di luciferasi con costrutti reporter contenenti LTR di HIV-1 wt o mut nelle sequenze ISRE e nella regione enhancer trasfettati in cellule T Jurkat infettate con HIV-1 o stimolate con TNF-alpha. L'interazione fisica fra IRF-1 ed NF-kB è stata dimostrata con saggi di legame proteina/DNA (oligo pull-down ed EMSA) usando estratti nucleari di cellule Jurkat trattate con TNF-alpha od infettati con HIV-1 e anticorpi specifici per IRF-1 e per la sub-unità p65 di NF-kB.

Risultati: Abbiamo dimostrato che IRF-1 ed NF-kB sono in grado di interagire fisicamente e formare un complesso di legame al DNA nella regione enhancer dell'LTR. Il complesso è trascrizionalmente attivo e risulta in una cooperazione fra i due fattori nell'attivazione dell'LTR. Mutazioni della regione enhancer che eliminano la formazione del complesso IRF-1/NF-kB si traducono in una diminuzione significativa dell'attività trascrizionale dell'LTR indotta da NF-kB.

Conclusioni: La dimostrazione che IRF-1 stimola la trascrizione dell'LTR sia legandosi alla sua sequenza consenso ISRE sia formando un complesso di legame al DNA con NF-kB e che la presenza di IRF-1 è necessaria per un'ottimale stimolazione anche da parte di NF-kB rafforza il ruolo chiave svolto da IRF-1 nella replicazione di HIV-1 soprattutto nelle fasi precoci dell'infezione e durante la riattivazione dalla latenza quando il trasattivatore virale Tat è assente o presente a livelli molto bassi. Lo sviluppo di sistemi in grado di bloccare selettivamente nelle cellule infette l'espressione di IRF-1 ed NF-kB può pertanto rappresentare una strategia da usare a scopi terapeutici per inibire la replicazione virale nelle prime fasi dell'infezione o la sua riattivazione dalla latenza.

Contributo: 40F/C

CELLULE DENDRITICHE E INFEZIONE DA HIV: STUDI DI PATOGENESI E SVILUPPO DI STRATEGIE INNOVATIVE PER L'INDUZIONE DI RISPOSTE IMMUNI ANTIVIRALI

Caterina Lapenta* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Stefano Maria Santini (*); Massimo Spada (*); Simona Donati (*); Francesca Urbani (*); Stefania Parlato (*); Irene Canini (*); Paolo Sirabella (*); Filippo Belardelli (*)

Background: Le cellule dendritiche (DC) possono esercitare un duplice ruolo nell'infezione da HIV: i) bersaglio e "reservoir" del virus; ii) mediatori principali per la regolazione di risposte immuni. D'altra parte, è ormai evidente l'esistenza *in vivo* di tipi di DC con fenotipo e funzione differenti, dipendenti dal contesto di citochine prodotte. Nel nostro laboratorio, abbiamo caratterizzato le differenze di fenotipo e funzione di DC derivate da monociti dopo trattamento con GM-CSF/IFN-alfa (IFN-DC) rispetto a DC generate in presenza di IL-4/GM-CSF. Le IFN-DC caricate con HIV-1 inattivato con aldrithiol-2 (AT-2) sono in grado di indurre risposte immuni umorali e cellulari potenzialmente protettive contro il virus nel modello di topi hu-PBL-SCID.

Metodi: DC ottenute da monociti CD14+ trattati con GM-CSF/IFN-alfa e GM-CSF/IL-4 sono state caratterizzate per l'espressione di marcatori cruciali per l'interazione con HIV, quali CD4, CXCR4, CCR5 e DC-SIGN. Topi hu-PBL-SCID sono stati infettati inoculando i.p. le DC autologhe infettate *in vitro* con HIV-1. A vari tempi, sono stati valutati: i) RNA virale nel plasma delle xenochimere; ii) tasso di deplezione dei linfociti umani T CD4+; iii) carico provirale negli organi. Studi sui profili di espressione genica sono stati effettuati utilizzando la tecnologia dei DNA microarrays con la piattaforma Affymetrix (22.283 geni), usufruendo del servizio della Società Genopolis (Milano) per l'ibridazione dei campioni su GeneChip Affymetrix.

Risultati: Le IFN-DC hanno mostrato livelli più bassi di CD4, CXCR4, CCR5 e DC-SIGN rispetto alle IL-4-DC. Dopo 3 giorni dall'infezione, i due tipi di DC mostravano un paragonabile carico provirale, anche se le IFN-DC producevano meno virus libero e mostravano scarsa capacità di trasmettere l'infezione a PBMC attivati. Quando i due tipi di DC infettate con HIV-SF162 venivano inoculate in topi "hu-PBL-SCID", l'analisi degli animali inoculati a 2 settimane mostrava un paragonabile tasso di deplezione dei linfociti umani T CD4+ e di carico provirale negli organi, anche se i topi trattati con IFN-DC infette mostravano un basso carico di RNA virale nel plasma. Per quanto concerne gli studi dei profili di espressione genica nei due tipi di DC, l'analisi ha evidenziato 82 geni significativamente up-regolati dall'IFN-alfa rispetto al trattamento con l'IL-4 e 80 geni che risultavano invece up-regolati dall'IL-4. In particolare, le IFN-DC mostravano un'iperespressione di geni coinvolti nei processi immunologici, compresi geni per citochine e chemochine e geni coinvolti nel processamento e presentazione antigenica.

Conclusioni: I risultati suggeriscono che le IFN-DC hanno una ridotta espressione di recettori/co-recettori per il virus e una diminuita capacità di trasferire l'infezione *in vitro* e *in vivo*. D'altra parte, il set di geni up-regolati nelle IFN-DC rispetto alle IL4-DC è consistente con una loro maggiore attività di APC. Tutto ciò, insieme all'evidenza della particolare capacità delle IFN-DC "pulsate" con AT-2-HIV-1 di indurre anticorpi neutralizzanti e cross-priming di linfociti CD8+ contro antigeni di HIV, suggerisce un interesse particolare per tali DC come mediatori di risposte antivirali protettive e per strategie di vaccinazione terapeutica in pazienti HIV-infetti.

Contributo: 40F/D

A RETROINVERSO PEPTIDE REPRODUCING THE TRP-RICH MOTIF OF THE FIV TM HAS FAVORABLE PHARMACOLOGICAL TRAITS AND MARKEDLY REDUCES VIRAL LOADS IN A SHORT-MONOTHERAPY EXPERIMENT

Simone Giannecchini* (*Centro Retrovirus e Sezione Virologia, Università degli Studi di Pisa*); Maria Claudia Alcaro** (*Università degli Studi di Firenze*); Patrizia Isola (*); Olimpia Sichi (*); Mauro Pistello (*); Anna Maria Papini (**); Paolo Rovero (**); Mauro Bendinelli (*)

Background: In recent years, improved understanding of structural features and functions in cell entry of HIV transmembrane glycoprotein (TM) has permitted development of a first generation fusion inhibitors modeled on this molecule. However, only enfuvirtide (36-mer peptide also known as T-20) has entered the clinic. Lack oral availability, high sensitivity to proteolytic digestion, and immunogenicity are major concerns raised by these large-molecule peptide inhibitors. We have focused on the short segment unusually rich in Trp residues (TrpM) present membrane-proximally in the ectodomain of the TM of all lentiviruses as a possible target for modeling small peptide inhibitors. This motif has interesting structural and functional features that make it attractive under this respect. Recently, using FIV as a model system, we showed that peptides reproducing the TrpM are indeed inhibitory, and that their size can be reduced down to few amino acids without loss of *in vitro* activity. One of these peptides, the 8-mer C8, was then extensively characterized. To overcome poor stability of C8 which could limit *in vivo* efficacy, we also developed a retroinverso analogue of C8 (riC8) that *in vitro* showed much increased stability and potent antiviral activity. To grasp additional information to be used in development of similar HIV inhibitors, in this study we performed a short-term monotherapy experiment in chronically FIV infected cats using riC8.

Methods: Peptide synthesis: Peptides were synthesized by conventional solid-phase strategy. Pharmacokinetics: Twenty mg of the peptides were inoculated subcutaneously into specific-pathogen-free (SPF) cats. The concentration peptides in serum was then measured at intervals by liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. Treatment protocol: Twenty-nine viremia-positive FIV-infected SPF cats were treated with a daily subcutaneous injection of 20 mg of riC8 or C8, dissolved in 200 microliters of DMSO, or solvent alone for 21 days. Plasma viral load (VL) measurements: VLs were determined by enumerating viral RNA copies in plasma by real-time TaqMan PCR.

Results: At a difference with C8, inhibitor riC8 showed a high stability when incubated in cat serum at 37°C. Furthermore, when injected into cats riC8 proved non-toxic at high doses and demonstrated favorable pharmacokinetic properties. Finally, treatment of FIV-infected cats with riC8 achieved a marked and progressive reduction of their plasma VL that was not seen with C8 or solvent alone. After riC8 treatment was stopped, VLs rapidly returned to pre-treatment levels.

Conclusions: The present findings demonstrate that the TrpM of lentiviruses can be used to design short fusion inhibitory peptides. They also show that short peptides designed on the TrpM can exert substantial antiviral activity *in vivo* provided that their stability is appropriately increased. This represents the first evidence so far that short peptides can be clinically useful. We are currently trying to develop similar peptides anti-HIV.

Grant: 40F.11

LA COINFEZIONE HIV-1/HTLV-II È ASSOCIATA AD UN RALLENTAMENTO DELLA PROGRESSIONE AIDS

Marco Turci* (*Università degli Studi di Verona*); Donato Zipeto (*) ; Elisabetta Pilotti** (*Università degli Studi di Parma*); Paola Ronzi (**); Claudio Casoli (**); Umberto Bertazzoni (*)

Background: La coinfezione da HIV-1 e da Human T-cell Leukemia Virus type II (HTLV-II) si riscontra in circa il 5-10% dei tossicodipendenti (IDU) italiani. Al fine di chiarire l'entità del fenomeno e comprendere quale influenza possa esercitare l'infezione da HTLV-II sull'andamento della malattia da HIV-1, abbiamo analizzato, dal 1986 ad oggi, 3574 IDU italiani per la presenza di HIV-1 e HTLV-I/II ed abbiamo monitorato per 13 anni due gruppi distinti, uno di coinfezioni HIV-1/HTLV-II e l'altro di monoinfezioni HIV-1. Per comprendere l'effetto della terapia anti HIV-1 sulla infezione da HTLV-II in pazienti coinfezionati, sono stati analizzati i livelli di carico provirale di HTLV-II ed altri parametri cellulari prima e dopo la terapia. Infine sono stati presi in esame le condizioni cliniche e virologiche di 13 soggetti naive monoinfezionati da HTLV-II.

Metodi: I sieri di 3574 IDU, appartenenti a diversi centri del nord e centro Italia, sono stati analizzati per la presenza di HIV-1, HTLV-I e HTLV-II e la positività è stata confermata mediante WB e PCR sui PBMC. È stato messo a punto un nuovo metodo di analisi PCR real time sulle sequenze del gene tax di HTLV-II. Per esaminare l'influenza di HTLV-II sulla progressione AIDS, sono stati seguiti, sia sul piano clinico che virologico, due gruppi distinti di IDU, uno di 437 monoinfezioni HIV-1 e un altro di 96 coinfezioni HIV-1/HTLV-II che presentavano all'entry un numero paragonabile di CD4 e di anni IDU.

Risultati: La frequenza di infezione da HTLV-II negli IDU è risultata significativamente più elevata ($P < 0.0001$) tra i 2371 soggetti HIV-1 positivi (6.7%) che tra i soggetti HIV-1 negativi (1.1%). I dati ottenuti dopo 13 anni di follow-up dei due gruppi IDU, HIV-1 monoinfezioni e HIV-1/HTLV-II coinfezioni, hanno mostrato che la coinfezione è associata con un'età media più alta ($P < 0.0001$) e un numero più elevato di CD4 ($P < 0.0001$) e CD8 ($P < 0.001$) rispetto a quanto riscontrato nei soggetti HIV-1 monoinfezioni. Inoltre si è rilevato un numero significativamente superiore ($P < 0.0001$) di long term nonprogressors (LNTP) tra i coinfezioni (13/96; 13.5%) che tra gli HIV-1 monoinfezioni (5/437; 1.1%). La distribuzione della carica provirale di HTLV-II negli IDU coinfezioni ha mostrato che gli LNTP presentano un numero significativamente inferiore ($P < 0.001$) di valori non rilevabili. L'effetto della terapia antiretrovirale sull'infezione da HTLV-II è stata misurata in 5 soggetti coinfezioni che sono stati seguiti prima e durante la terapia. È stato riscontrato un aumento significativo ($P < 0.05$) nel carico provirale di HTLV-II a circa un anno dopo l'inizio della terapia, accompagnato da una caduta della viremia HIV-1 e da un aumento di CD4 e CD8. Il follow-up clinico e virologico di 13 soggetti monoinfezioni da HTLV-II non ha messo per ora in evidenza particolari patologie correlabili all'infezione.

Conclusioni: I risultati sperimentali presentati in questo studio rivelano che una percentuale significativa di IDU italiani coinfezioni da HIV-1/HTLV-II mantiene livelli elevati di CD4 e si configura come LNTP. Questo sta ad indicare che l'infezione da HTLV-II è in grado di esercitare un ruolo protettivo contro la progressione della malattia HIV-1/AIDS in un numero significativo di soggetti coinfezioni dai due virus. Si è altresì messo in evidenza che la terapia antiretrovirale in soggetti coinfezioni è efficace nel combattere l'infezione da HIV-1 ma non contro l'infezione da HTLV-II dato che porta ad un aumento del carico provirale di HTLV-II.

Contributo: 40F.12

SUSCETTIBILITÀ DI CELLULE DI MACACA FASCICULARIS ALL'INFEZIONE DA HIV-1

Barbara Ridolfi* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Stefania Catone (*); Domenico Fulgenzi (*); Barbara Ensoli (*); Alessandra Borsetti (*)

Background: È noto che la replicazione di HIV-1 *in vitro* è limitata a cellule umane e a quelle di alcune scimmie antropomorfe, per la presenza di uno o più inibitori delle infezioni lentivirali prodotti dal genoma dei primati. Recentemente è stato individuato il maggiore fattore di restrizione in cellule di scimmia contro l'infezione di HIV-1, il TRIM5alfa. In un recente studio abbiamo dimostrato che una linea B linfoblastoide (F6) di *Macaca fascicularis* stabilizzata *in vitro*, può essere produttivamente infettata con l'HIV-1 T-tropico (Ridolfi *et al.*; AIDS Res. Hum. Retro. 2004). Dall'infezione acuta delle cellule F6 si è inoltre ottenuta una linea cronicamente infetta con il ceppo HXBc2. Nelle cellule F6 quindi, il fattore di restrizione TRIM5alfa descritto in altre linee cellulari di scimmia, sembrerebbe essere inattivo o non essere espresso.

Metodi: Per determinare la presenza dei trascritti del fattore di restrizione TRIM5alfa, gli RNA totali estratti da cellule F6, da cellule di *m. fascicularis* quali PBMC, BLCL, HSCF-4, da macaca rhesus quali FRh-K4, LLC-MK2 e da cellule umane C8166 e 293 sono stati analizzati tramite RT-PCR, utilizzando oligonucleotidi specifici per le regioni conservate di TRIM5alfa. Inoltre per aumentare la sensibilità e valutare il numero di copie di RNA messaggeri di TRIM5alfa presenti nelle cellule F6 e nelle altre linee cellulari, gli RNA sono stati retrotrascritti utilizzando oligonucleotidi random ed i cDNA analizzati quantitativamente mediante Real-Time PCR. La normalizzazione dei campioni per qualità e quantità è stata effettuata sull'RNA messaggero dell'actina.

Risultati: In un primo screening l'RT-PCR non ha evidenziato la presenza del fattore di restrizione nelle cellule F6 comparate alle cellule di controllo. In seguito, l'analisi effettuata tramite Real-Time PCR ci ha permesso di valutare la presenza di un numero molto basso di copie di RNA nelle cellule F6, di circa 20-40 volte inferiore alle cellule di controllo. Questo risultato spiegherebbe la suscettibilità delle cellule F6 all'infezione da HIV-1.

Conclusioni: Attualmente, stiamo producendo linee di cellule F6 esprimenti stabilmente TRIM5alfa umano e di scimmia e valutarne quindi l'infettabilità con l'HIV-1. Questo ci permetterà di verificare se anche nel nostro sistema d'infezione (F6/HIV-1) il TRIM5alfa sia il fattore di restrizione all'infezione da HIV-1 o se altri fattori cellulari/virali rendano le cellule F6 suscettibili all'infezione. Il modello d'infezione F6/HIV-1 è unico poiché diversamente dai precedenti modelli cellulari ottenuti silenziando l'RNA di TRIM5alfa, offre la possibilità di studiare sia i diversi aspetti del tropismo di HIV-1 che i meccanismi d'infezione specie specifici tramite un'infezione naturale. Tali informazioni saranno fondamentali per la progettazione di nuovi farmaci contro l'infezione da HIV-1.

Contributo: 40F/E

TERAPIA GENICA ANTI-HIV-1 BASATA SUL GENE TERAPEUTICO F12-VIF

Giuliana Vallanti* (*Molmed, Università degli Studi di Modena*); Rossella Lupo (*)
Maurizio Federico (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Fulvio Mavilio (*)
Chiara Bovolenta (*)

Background: La terapia genica rappresenta una delle strategie più promettenti in sostituzione o combinazione a quelle attualmente esistenti per la lotta contro l'AIDS. Essa si basa sul trapianto autologo di linfociti T o dei loro precursori emopoietici ("human stem cells", HSCs) trasdotti con vettori codificanti geni antivirali allo scopo di ridurre la diffusione di HIV-1 e la ricostituzione di interi "lineages" linfocito-macrofagici potenzialmente resistenti ad una futura infezione. L'obiettivo della nostra ricerca è caratterizzare nuovi geni terapeutici anti-HIV. A questo proposito abbiamo utilizzato il mutante naturale del gene accessorio "viral infectivity factor" (vif), F12-vif, per le sue già dimostrate capacità di inibire la replicazione di HIV-1. A fronte dei recenti e numerosi studi che hanno identificato in Vif la proteina in grado di bloccare l'azione dell'inibitore cellulare APOBEC3G, il mutante F12-Vif riveste un ruolo di particolare interesse.

Metodi: Abbiamo generato tre vettori lentivirali di seconda generazione, basati sul genoma di HIV-1: il vettore vuoto, quello terapeutico e quello di controllo. Il primo contiene al suo interno solo la cassetta d'espressione PGKDeltaLNGFR per l'espressione costitutiva del recettore ad alta affinità dell'NGF che permette la rapida ed efficiente selezione delle cellule trasdotte. Gli altri due vettori contengono, oltre al marker di selezione, rispettivamente il gene terapeutico, F12-vif, e quello di controllo, WT-vif. Questi ultimi sono sotto il controllo trascrizionale dell'LTR non modificato del vettore in maniera Tat dipendente per consentire l'espressione del transgene principalmente in cellule HIV-1+. I vettori lentivirali sono stati prodotti mediante co-transfezione di cellule 293T con il costrutto di "packaging" codificante Gag, Pol, Tat e Rev, il costrutto codificante l'envelope VSV-G e i rispettivi "transfer vectors" sopra descritti. Linfociti primari e varie linee linfocitarie T sono state trasdotte, selezionate mediante anti-NGFR Abs, e successivamente infettate con HIV-1. La replicazione di HIV-1 è stata valutata grazie a RT-assay o p24Ag ELISA dei surnatanti di coltura delle cellule infettate.

Risultati: I nostri esperimenti hanno dimostrato: 1) l'espressione Tat-dipendente di F12-Vif e WT-Vif, sia a livello trascrizionale che traduzionale mediante analisi di Northern e Western blot; 2) l'integrazione genomica dei vettori nelle varie linee cellulari mediante analisi Southern blot; 3) che linfociti T primari e linee cellulari T che esprimono F12-Vif sono resistenti all'infezione sia da ceppi X4 che R5 di HIV-1. Cellule che esprimono F12-Vif mostrano una riduzione di 5 logs della produzione di p24Ag rispetto alle cellule di controllo; 4) che F12-Vif inibisce la replicazione di HIV-1 in maniera APOBEC-3G indipendente; 5) che le cellule che esprimono F12-Vif producono in un "single-cycle infection assay" una ridotta quantità di particelle virali rispetto alle cellule di controllo; 6) che la ridotta quantità di virus prodotta dalle cellule che esprimono F12-Vif non è infettiva.

Conclusioni: In conclusione, F12-vif può essere considerato un ottimo candidato per un approccio di terapia genica anti-HIV-1. Inoltre, F12-Vif può essere utilizzato come uno strumento di ricerca per la comprensione dei complessi meccanismi molecolari che regolano la funzione del gene accessorio vif. I nostri dati infatti suggeriscono che Vif, oltre ad inibire la funzione antivirale di APOBEC3G, deve essere coinvolto in altre funzioni rilevanti durante il ciclo replicativo di HIV-1.

Contributo: 40F.13

SYSTEMIC AND MUCOSAL IMMUNITY INDUCED BY HIV-1 VIRUS-LIKE PARTICLES EXPRESSING A CLADE A ENVELOPE ADMINISTERED BY DIFFERENT ROUTES ALONE OR IN PRIME/BOOST PROTOCOLS

Luigi Buonaguro* (*Istituto Nazionale Tumori "G. Pascale", Napoli*); Maria Lina Tornesello (*); Maria Tagliamonte (*); Jorma Hinkula (*Swedish Institute Infectious Disease Control, Dept. of Virology, Stockholm, Sweden*); Ulf Schroeder (*Eurocine AB, Karolinska Science Park, Stockholm, Sweden*); Franco Maria Buonaguro (*)

Background: To evaluate and compare the induction of immune response in an animal model by an anti-HIV-1 vaccine based on HIV-1 Pr55gag-structured Virus-Like Particles (VLPs), expressing a gp120 from an Ugandan HIV-1 isolate of the clade A (HIV-VLPA), injected by different administration routes alone or within DNA/VLP prime-boost protocols.

Results: The immunization by the i.p. as well as the i.n. administration routes induce specific cellular immunity along with a systemic and mucosal IgG and/or IgA response, showing an ex-vivo neutralizing activity on both autologous and heterologous field isolates. Different DNA/HIV-VLP prime-boost doses and schedules have been tested by i.n. immunization, showing potent additive/synergistic effects on humoral and cellular responses. The HIV-VLPA administration in a novel mucosal adjuvant allows scaling down to 1/10th of the original dose, retaining similar levels of immunogenicity.

Conclusions: The induction by i.p. as well as i.n. administration of humoral immunity at mucosal sites, the main port of entry for the HIV-1 infection, is of relevant interest. The DNA/VLP prime/boost immunization strategy shows an effective and prolonged additive/synergistic immunization effect and the use of specific adjuvants allows to sensibly lower the immunization dose, with a reduction of possible *in vivo* side effects. The ex-vivo cross-clade neutralization of primary field isolates suggests a broad spectrum of HIV-1 clades in-vivo containment by the HIV-VLPAs vaccine strategy.

Grant: 40F.14

DALLA RESISTENZA NATURALE AL DISEGNO DI VACCINI: APPROCCI INNOVATIVI PER PREVENIRE E CURARE L'INFEZIONE DA HIV

Samuele Burastero* (*IRCCS S. Raffaele, Milano*); Lucia Lopalco (*); Clara Paolucci (*); Francesca Sironi (*); Daniela Breda (*); Adriano Lazzarin (*); Paolo Lusso (*)

Background: Individui ripetutamente esposti ad HIV che rimangono sieronegativi (ESN: exposed seronegative) rappresentano un *experimentum naturae* nel quale vengono ricapitolati vari fattori congeniti e acquisiti che contribuiscono alla resistenza ad HIV. Tra i fattori acquisiti, nel nostro laboratorio abbiamo identificato in alcuni individui ESN una risposta anticorpale specifica per epitopi esposti in modo transitorio sul complesso di “docking” del virus alla cellula bersaglio, inclusi il CD4 e il corecettore. In particolare, in diverse coorti di soggetti ESN di diversa origine etnica (italiani, vietnamiti, cambogiani) confrontando il titolo di tali anticorpi con quello osservato in soggetti di controllo non esposti al virus, abbiamo provato che la presenza di anticorpi specifici per tale complesso molecolare è un fattore predittivo dell'avvenuta esposizione ad HIV (*J. Gen. Virol.* 2005).

Metodi: Con lo scopo di riprodurre *in vitro*, in modo permanente, un set di epitopi conformazionali con le caratteristiche sopra citate, abbiamo utilizzato vettori vaccinici ricombinanti nei quali sono state clonate Env di HIV di diversi sottotipi. Con tali vettori si sono infettate cellule murine NIH-3T3 che, dopo averle decorate con CD4 ricombinante solubile, sono state inoculate in topi Balb/c. Al fine di stabilizzare i complessi di membrana, si sono usati diversi protocolli di fissazione. Inoltre, per validare ciascun reagente prima di ogni inoculo si è verificata la presenza di reattività con anticorpi monoclonali specifici per epitopi conformazionali indotti dall'ingaggio del CD4 con gp120. Tra questi, abbiamo osservato che il monoclonale D19 riconosceva un epitopo della gp160 trimerica di isolati R5 ristretti solo dopo interazione con CD4 solubile, mentre tale epitopo era costitutivamente espresso da Env trimerica di isolati X4 (*J. Virol.* 2005).

Risultati: Abbiamo trovato che sieri ottenuti con tali immunogeni contenevano un'attività di legame specifica per epitopi del complesso CD4-Env da cui dipendeva un'inibizione della replicazione di HIV estesa a sottotipi anche molto divergenti rispetto a quello utilizzato per l'immunizzazione. Abbiamo isolato anticorpi monoclonali da tali animali, in grado di legare preferenzialmente epitopi del complesso CD4-gp120. Uno di questi (C9-F11) è stato studiato in maggiore dettaglio. Abbiamo trovato che C9-F11 è un monoclonale IgG1/lambda specifico per un epitopo situato su uno dei primi due domini di CD4, distinto da quello riconosciuto da Leu3a, OKT4, SIM-2 e SIM-4. Tale monoclonale ha un vasto spettro di neutralizzazione nei confronti di isolati primari, scarsa capacità di fissare il complemento e di regolare negativamente l'espressione di CD4 sulla membrana dei linfociti. Abbiamo infine osservato che IgG isolate dal siero di soggetti ESN della coorte italiana studiata presso il nostro Dipartimento di Malattie Infettive competono con tale monoclonale per il legame all'epitopo di C9-F11.

Conclusioni: Questi risultati sostengono ulteriormente l'ipotesi che l'immunità umorale diretta verso epitopi specifici per il complesso Env-recettore/co-recettore è uno dei possibili fattori di protezione dall'infezione da HIV e che l'utilizzo di immunogeni che ne riproducono le caratteristiche è in grado di indurre la generazione di anticorpi con le caratteristiche di “entry inhibitors” ad ampio spettro di neutralizzazione.

Contributo: 40F.15

CLONAGGIO, CARATTERIZZAZIONE E DISSEZIONE MOLECOLARE DELLA RISPOSTA IMMUNE NATURALE ANTICORPALE ANTI-TAT

Nicasio Mancini* (*Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Vita-Salute, Milano*); Filippo Canducci (*); Silvia Carletti (*); Mario Perotti (*); Fabio Santoro (*); Roberto Burioni (*)

Background: Gli “anticorpi naturali” sono immunoglobuline (Ig) dirette contro un agente infettivo pur non essendone stata da esso stimolata la produzione e rappresentano secondo alcuni una prima linea di difesa contro i patogeni. Nello studio degli anticorpi naturali in corso di infezione da HIV, particolare attenzione è stata riservata alle IgM capaci di legare la proteina Tat che si sono rivelati efficaci nel limitarne alcune funzioni, come l’induzione di apoptosi nei linfociti T. Simili dati, associati al riscontro di alti livelli di anticorpi naturali anti-Tat in pazienti long-term survivor, hanno fatto ipotizzare un loro ruolo protettivo nelle fasi iniziali dell’infezione.

Metodi: Il principale problema relativo allo studio degli anticorpi naturali è legato alla loro scarsità nel repertorio anticorpale dei soggetti adulti, ed alla loro bassa affinità per l’antigene. Questi fattori rendono spesso insufficiente l’approccio classico. Nel presente studio, il repertorio anticorpale di un paziente HIV-negativo è stato clonato in un vettore combinatoriale di esposizione fagica e selezionato su una proteina Tat ricombinante. Tale approccio ha permesso di ottenere un Fab di isotipo IgG capace di legare la proteina virale. Le sequenze di DNA codificanti le catene del Fab sono state analizzate, valutandone la percentuale di mutazioni somatiche rispetto a sequenze germline di riferimento. Il contributo delle singole catene al legame su Tat è stato infine studiato con Fab ibridi, ottenuti associando le catene dell’anticorpo anti-Tat a quelle di un altro anticorpo dello stesso paziente con caratteristiche di legame note.

Risultati: Lo studio ha dimostrato la presenza nel repertorio anticorpale di pazienti HIV-negativi, non solo di anticorpi naturali anti-Tat di isotipo IgM, ma anche di cloni IgG derivanti da switch isotipico e quindi più esposti a mutazioni somatiche. Nell’analisi molecolare dell’anticorpo ottenuto (Tat1), specifica attenzione è stata riservata al pattern di mutazione della catena pesante che è stata assegnata alla sottofamiglia V3-23, un germline i cui geni sono spesso rappresentati nel repertorio anticorpale fetale. A differenza di quanto osservato negli anticorpi naturali di isotipo IgM finora descritti, la bassa omologia (90%) di Tat1 rispetto al germline indica l’intervento di processi di mutazione somatica. Inoltre, lo studio del framework (FR) e delle complementarity determining region (CDR) ha evidenziato un pattern di mutazione anomalo, ovvero non limitato ai CDR ma diffuso in maniera omogenea anche a livello degli FR. L’importanza di una simile catena pesante nel determinare le caratteristiche di legame del Fab è stata confermata dagli esperimenti con i Fab ibridi.

Conclusioni: Il presente studio descrive il clonaggio e la caratterizzazione del primo anticorpo naturale umano anti-Tat di isotipo IgG (Tat1). Al contrario di altri cloni descritti di isotipo IgM, Tat1 non deriva da una semplice associazione di geni VDJ identici al germline presenti nel repertorio originale del paziente, ma piuttosto da meccanismi di stimolazione somatica indotta da antigeni non meglio identificabili, ma sicuramente non associati al virus HIV. I dati raccolti ed i meccanismi di maturazione proposti, associati allo studio dell’attività biologica dell’anticorpo in questione e di molecole simili, potrebbero permettere una migliore comprensione del ruolo svolto dagli anticorpi naturali anti-Tat nel rapporto ospite-virus in corso di infezione da HIV.

Contributo: 40F.16

TAT MODULA L'INFEZIONE DA HIV-1 MEDIANTE UN'INTERAZIONE SPECIFICA CON GP120 SULLA SUPERFICIE CELLULARE

Serena Marchiò* (*Dip. di Scienze Oncologiche, Università degli Studi di Torino*); Massimo Alfano** (*Dip. di Immunologia & Malattie Infettive, San Raffaele, Milano*); Luca Primo (*) (*Luca Butini (Dip. di Medicina Interna, Servizio di Immunologia Clinica, Università delle Marche)*); Luisa Gennero (*Divisione di Malattie Infettive, Ospedale Amedeo di Savoia, Torino*); Mauro Giacca (*International Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste*); Federico Bussolino (*)

Background: Tat è liberato dalle cellule infette sia *in vitro* che *in vivo*, e svolge attività biologiche extracellulari. È interessante notare che Tat sembra avere anche un effetto diretto, non trascrizionale, nella diffusione dell'infezione. In accordo con un ruolo per Tat extracellulare nell'infettività, anticorpi circolanti anti-Tat correlano con una bassa viremia nei pazienti sieropositivi. Queste osservazioni sono confermate dall'abilità di anticorpi anti-Tat nell'abbassare la viremia sia *in vitro* che *in vivo*. Nonostante l'enorme e spesso controversa produzione scientifica riguardante Tat, finora il meccanismo molecolare responsabile di questo effetto non è ancora stato chiarito.

Metodi: Lo studio della localizzazione di Tat è stato effettuato con tecniche di immunofluorescenza. La valutazione dell'aumento dell'infettività Tat-mediato è avvenuta mediante trasduzione con vettori lentivirali [il virus è stato preparato in cellule trasfettate con i seguenti plasmidi: pCMV. deltaR8.2 ("core" del virus con tutte le proteine accessorie), pHIV.env (gp120 envelope di HIV-1), pPGK.GFP (vettore "reporter" per l'espressione della GFP). La percentuale di cellule infette è stata valutata al citofluorimetro, analizzando la presenza della GFP] e con HIV-1 [PBMCs sono stati infettati con due ceppi di HIV-1, III B e Ba-L]. Le regioni di gp120 implicate nell'interazione con Tat sono state identificate con phage display; l'interazione Tat/gp120 è stata studiata con analisi BiaCore e con saggi ELISA utilizzando le proteine ricombinanti.

Risultati: In questo lavoro abbiamo innanzitutto osservato che Tat viene rilasciato dalle cellule infettate con HIV-1 e si lega alla superficie cellulare sia delle cellule infette, sia di cellule sane adiacenti. Abbiamo quindi valutato il ruolo di Tat nell'infettività virale, osservando che Tat extracellulare è in grado di aumentare l'ingresso nella cellula sia di vettori lentivirali ricoperti da gp120, sia di HIV-1. Abbiamo dimostrato che questo meccanismo dipende da un legame specifico fra Tat e gp120 che avviene sulla superficie cellulare. Abbiamo anche osservato la presenza di Tat sulla superficie di cellule da pazienti HIV-1 positivi, e la possibile co-localizzazione con gp120. Abbiamo caratterizzato le regioni di Tat (regione C-terminale) e di gp120 (loop V1/V2) implicate in questa interazione ($K_d = 8 \text{ nM}$); peptidi gp120 mimetici sono in grado di spiazzare l'interazione Tat/gp120 inibendo l'infezione e la propagazione virale.

Conclusioni: In questo lavoro abbiamo dimostrato che Tat legato alla membrana cellulare è un nuovo mediatore dell'ingresso di HIV-1. In particolare, abbiamo mostrato che Tat è presente sulla superficie di cellule infettate da HIV-1 e di cellule adiacenti non infette, dove è legato in modo specifico dalla proteina gp120 dell'envelope virale. La conseguenza è un aumento del legame del virus sulla superficie, e del suo ingresso nella cellula.

Contributo: 40F.17

LA RIMOZIONE SELETTIVA DI ANIONI SUPEROSSIDO BLOCCA I PROCESSI MATURATIVI DI HIV NEI MACROFAGI E PREVIENE L'APOPTOSI IN CELLULE NEURONALI

Stefano Aquaro* (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Carolina Muscoli (*Università degli Studi di Catanzaro*); Alessandro Ranazzi (*); Maria Concetta Bellocchi (*); Teresa Granato (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Michela Pollicita (*); Emanuela Balestra (*); Patrizia Saccomandi (*); Vincenzo Mollace (*); Carlo Federico Perno (*); Raffaele Calìo (*)

Background: L'infezione da HIV-1 è caratterizzata da aumento dei livelli sierici di malonildialdeide e idroperossidi (entrambi indicatori di stress ossidativo). Inoltre, HIV-1 induce alterazione della omeostasi cellulare con conseguente produzione di radicali liberi. I monociti-macrofagi (M/M) rappresentano le cellule lungo sopravvivententi che maggiormente contribuiscono alla produzione di HIV-1 in ogni fase della malattia, anche in corso di terapia antiretrovirale, sia nel compartimento sistemico sia nei "reservoir" anatomici del virus, come il sistema nervoso centrale. Nei M/M infettati da HIV-1 si registra diminuzione della produzione di glutatione, aumento dell'espressione della forma mitocondriale dell'enzima superossido dismutasi (MnSOD) e rilascio di anioni superossido responsabili di morte cellulare programmata (apoptosi).

Metodi: M/M primari umani sono stati infettati *in vitro*, acutamente o cronicamente, con HIV-1. La produzione di anione superossido è stata determinata tramite metodo immunocitochimico per la presenza di nitrotirosina. L'espressione di geni cellulari è stata evidenziata tramite analisi con microarray. La produzione virale è stata misurata nei sovrinatanti di coltura tramite dosaggio della p24 (ELISA). Lo stato di maturazione del virus è stato valutato misurando l'espressione intracitoplasmatica delle proteine p24 e p55 (western blot). La microscopia elettronica ha fornito informazioni a livello ultrastrutturale. La capacità infettante del virus è stata valutata attraverso titolazione biologica. La capacità neuropatogenetica dei M/M infettati da HIV-1 è stata saggiata su cellule neuronali immortalizzate (SK-N-SH e CHP100) tramite la misurazione dell'apoptosi (FACS). Gli esperimenti sono stati condotti in presenza o meno di M40401 (farmaco mimetico della MnSOD).

Risultati: HIV-1 ha attivato i geni SOD e SOD1 nei M/M, parallelamente ad un notevole aumento della produzione di nitrotirosina rispetto ai controlli. M40401 ha drasticamente ridotto la presenza di nitrotirosina. La maturazione delle proteine p55 e p24 è stata fortemente inibita da M40401 in entrambe le condizioni di infezione. La microscopia elettronica ha confermato la drammatica riduzione di particelle virali mature a livello intracitoplasmatico ed extracellulare, durante trattamento con M40401. L'infettività del virus è risultata ridotta di oltre 1 log dal trattamento con M40401, così come la produzione di p24 sia nell'infezione acuta sia in quella cronica: rispettivamente inibizione del 99% e 90% rispetto ai controlli. I sovrinatanti dei M/M infettati da HIV-1 hanno indotto apoptosi in cellule SK-N-SH e CHP-100. L'analisi al FACS ha mostrato il 27,9% (p: 0,001) di apoptosi nelle SK-N-SH trattate con M40401 vs il 64,7% nei controlli. Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti con cellule CHP100.

Conclusioni: I risultati evidenziano il ruolo cruciale dell'anione superossido sia nella replicazione di HIV-1 nei M/M sia nella genesi della neurodegenerazione indotta dai M/M infettati. Farmaci mimetici della SOD, come M40401, possono potentemente incidere sulla replicazione di HIV-1 e contrastare il danno neuronale correlato ed è possibile ipotizzare l'inclusione di tali farmaci nei protocolli terapeutici già esistenti.

Contributo: 40F.18

L'ESPRESSIONE DI CD154 MEDIA L'EFFETTO ANTI-APOPTOTICO E MOTOGENICO DI TAT SU CELLULE DI SARCOMA DI KAPOSÌ

Vincenzo Cantaluppi* (*Dip. di Medicina Interna, Università degli Studi di Torino*); Maria Chiara Deregibus (*); Luigi Biancone (*); Ilaria Deambrosis (*); Adriana Albini (*Lab. di Oncologia Molecolare, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova*); Giovanni Camussi (*)

Background: Nei pazienti con AIDS il sarcoma di Kaposi (KS) ha un comportamento particolarmente aggressivo con una diffusa capacità di disseminazione e resistenza alla chemioterapia che ha fatto ipotizzare il contributo patogenetico di alcune proteine di HIV-1. In particolare è stato dimostrato che HIV-1-Tat è in grado di agire in sinergia con altre molecole pro-angiogenetiche come VEGF e bFGF nell'induzione di KS. Abbiamo precedentemente dimostrato che Tat è un fattore anti-apoptotico per le cellule KS. Inoltre abbiamo dimostrato che CD40, una glicoproteina di membrana di 50 kDa con azione di costimolazione linfocitaria espressa anche su cellule endoteliali e cellule KS, stimola la proliferazione e la neoangiogenesi di questo tumore. Lo scopo di questo lavoro è valutare se l'attivazione del sistema recettoriale CD40-CD154 media gli effetti proliferativi, anti-apoptotici e motogenici di Tat sulle cellule KS.

Metodi: Abbiamo studiato l'espressione basale di CD40 e CD154 su cellule provenienti da lesioni cutanee di KS mediante analisi Western blot, citometria a flusso (FACS) e RT-PCR e la loro modulazione dopo stimolazione con Tat. Abbiamo valutato comparativamente l'effetto proliferativo, anti-apoptotico (TUNEL, colorazione con ioduro di propidio, estrazione di DNA genomico, test ELISA di attività delle caspasi 3,8 e 9) e motogenico (microscopia time-lapse) di HIV-1-Tat e CD154 sulle cellule KS. Per esplorare se l'effetto di Tat dipendesse dall'attivazione del sistema recettoriale CD40-CD154 abbiamo: a) utilizzato una proteina di fusione solubile sCD40fp capace di inibire l'interazione CD40 di membrana-CD154; b) generato mediante elettroporazione cellule KS trasfettate (KSsCD40) con il gene codificante per una forma solubile di CD40. Come controllo le cellule KS sono state trasfettate con il vettore vuoto (KSspv neo). Inoltre, abbiamo valutato dopo stimolo con Tat delle cellule KS l'attivazione delle vie di traduzione del segnale dipendenti dal'interazione CD40-CD154.

Risultati: -HIV-1-Tat induce un'augmentata espressione di CD40 ed in particolare di CD154 sulle cellule KS. Il Tat e il CD154 esercitano un comparabile effetto proliferativo, motogenico e di inibizione dell'apoptosi indotta da vincristina con aumento dell'espressione di Bcl-XL ed un'inibizione dell'attività delle caspasi 3, 8 e 9. Tali effetti erano inibiti dalla pre-incubazione delle cellule KS "wild type" con sCD40fp ed erano assenti nel clone trasfettante KSsCD40 ma non nel controllo KSspv neo, suggerendo che l'effetto di Tat sia mediato dall'interazione CD40 di membrana-CD154. Questa ipotesi è rafforzata dall'evidenza che la stimolazione delle cellule KS con Tat induce un'iper-espressione di TRAF-3, molecola di traduzione del segnale intracellulare indotta da CD40, e ne favorisce la co-precipitazione con il CD40 stesso.

Conclusioni: In conclusione, i risultati di questo studio indicano che gli effetti del Tat sulle cellule KS sono almeno in parte mediati dall'augmentata espressione di CD40 e del suo ligando CD154 con attivazione della via di traduzione del segnale CD40-mediato. Pertanto l'inibizione del sistema recettoriale CD40-CD154 è da valutare come possibile strategia per contrastare la proliferazione e la disseminazione del KS nei pazienti con AIDS.

Contributo: 40F.19

RUOLO DI TRAIL NELLA PATOGENESI DEL DANNO NEURONALE INDOTTO DALLA PROTEINA TAT DI HIV-1

Silvano Capitani* (*Università degli Studi di Ferrara*); Federica Corallini (*); Maurizio Previati (*); Cinzia Carini (*); Silva Saraceni (*); Carlo Contini (*)

Background: Un quadro ipotizzato per la patogenesi delle lesioni neurologiche associate all'AIDS Dementia Complex (ADC) assegna un ruolo importante alla proteina Tat, collocandola in una posizione chiave nel percorso che lega l'infezione al danno neuronale. Infatti poiché HIV non ha effetti diretti sui neuroni, il processo prevede l'infezione di cellule non neuronali in grado di produrre e rilasciare Tat che upregola varie citochine, tra cui TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand). TRAIL così prodotto e rilasciato potrebbe a sua volta esercitare effetti pro apoptotici sui neuroni. TRAIL è una citochina della famiglia del TNF in grado di indurre morte cellulare in una grande varietà di cellule neoplastiche senza compromettere in modo importante le cellule normali. In realtà TRAIL, come osservato recentemente anche dal nostro gruppo di ricerca, esercita effetti molto complessi sulle cellule bersaglio, reclutando numerosi effettori intracellulari della trasduzione del segnale. In anni recenti è comunque stato riportato come un numero crescente di tipi cellulari sia dotato di recettori per TRAIL e sia indotto da questa citochina all'esecuzione del programma di morte cellulare. Poiché evidenze del nostro e di altri gruppi di ricerca dimostrano che TRAIL viene upregolato nella sua espressione da Tat e che TRAIL può risultare apoptogeno sui neuroni, lo studio proposto prevedeva di determinare se TRAIL può avere un ruolo come mediatore degli effetti lesivi indotti da Tat nel sistema nervoso centrale.

Metodi: A) Determinazione mediante saggio ELISA dei livelli di TRAIL in campioni biologici quali liquido cerebro-spinale (LCS) e siero di pazienti affetti da HIV+ a differente espressione clinica, ed in campioni di controllo ottenuti da soggetti esenti da neuropatie HIV-correlate (infezioni meningoencefaliche di vario tipo, neuropatie degenerative od ischemiche).

B) Allestimento di colture primarie di neuroni da cervello di ratto su cui determinare l'espressione e la funzionalità dei recettori di TRAIL e le loro modificazioni in seguito al trattamento con proteina Tat.

Risultati: A) Dati preliminari su liquidi biologici di un gruppo randomizzato di pazienti affetti da varie neuropatie correlate o non con l'infezione da HIV indicano che TRAIL è dosabile, oltre che nel siero, anche nel LCS. Ulteriori studi sono in corso su campioni di pazienti selezionati per tipo di patologia allo scopo di determinare eventuali correlazioni fra livelli di TRAIL e lesione neurologica, soprattutto in pazienti HIV+.

B) Sono state allestite colture di neuroni corticali di ratto su cui è stata preliminarmente determinata l'espressione dei recettori di TRAIL. Sulla base dei risultati ottenuti, sono stati avviati studi tesi a valutarne le modificazioni di espressione e funzionalità in seguito al trattamento con la proteina Tat.

Conclusioni: I risultati che deriveranno da questi studi potranno consentire di valutare il ruolo di TRAIL rilasciato nel compartimento liquorale e dei TRAIL receptors come mediatori degli effetti lesivi indotti da Tat su cellule neuronali.

Contributo: 40F.20

EVOLUZIONE DELLA QUASISPECIE DI VIRIONI HIV CHE PRESENTANO MARCATORI DI DERIVAZIONE MONOCITARIA

Gabriella Rozera* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Isabella Abbate (*); Giampiero D'Offizi (*); Angela Corpolongo (*); Silvia Calcaterra (*); Maria R. Capobianchi (*)

Background: Dati precedenti hanno dimostrato che le molecole di derivazione cellulare presente sulla superficie dell'HIV, diverse a seconda del tipo cellulare che ospita la replicazione virale, possono essere utilizzate come marcatori della origine cellulare dei virioni. Sono stati studiati alcuni pazienti con infezione primaria e durante cicli successivi di interruzione strutturata di terapia, per valutare se la quasispecie virale che origina dai monociti evolva con modalità e tempi diversi rispetto all'intera quasispecie di virus circolante.

Metodi: Sono stati analizzati campioni sequenziali di plasma provenienti da 3 pazienti con infezione primaria, sottoposti a terapia antiretrovirale efficace, seguita da interruzioni strutturate della terapia (periodo di osservazione: 12-48 mesi), durante le quali si osservava un rebound virologico. L'analisi è stata eseguita, ai vari tempi, sia sulla totalità dei virioni circolanti, sia sulla sottopopolazione virale di derivazione monocitaria, separata mediante cattura con anticorpi diretti verso il marcatore monocitario CD36. L'utilizzo co-recettoriale è stato dedotto dalla sequenza della regione V3 di env. Lo studio della quasispecie è stato effettuato mediante sequenziamento diretto di prodotti di PCR del gene gag a diluizione limite. Sui cloni così ottenuti è stata determinata la diversità genetica, e sono stati costruiti i relativi alberi filogenetici.

Risultati: In tutti i pazienti la sequenza V3 env indicava un fenotipo dual-tropico R5X4 durante l'infezione primaria; in un solo paziente, a seguito del rebound virologico che accompagnava la sospensione della terapia, il virus evolveva verso un utilizzo co-recettoriale esclusivamente X4, mentre gli altri rimanevano R5X4. La diversità genetica della regione gag del virus catturato con gli anticorpi anti-CD36 è risultata essere mediamente inferiore rispetto al totale della popolazione virale circolante. Inoltre, nei singoli pazienti essa diminuiva durante i successivi rebound virologici che accompagnavano la sospensione, in maniera sostanzialmente simile sia nella sottopopolazione virale di derivazione monocitaria, sia nella popolazione circolante totale. In pazienti non sottoposti ad HAART al momento dell'infezione primaria, la diversità genetica mostrava invece una tendenza ad aumentare nel tempo. L'analisi filogenetica condotta sulla base della costruzione di un albero con tutte le sequenze gag indicava che la maggior parte delle sequenze derivanti dal virus catturato con gli anticorpi anti-CD36 segregava in un cluster separato rispetto ai cluster monofiletici dei singoli pazienti.

Conclusioni: L'approccio metodologico usato può consentire lo studio di virioni che provengono direttamente dai diversi reservoir cellulari presenti nel paziente infetto. La presenza di un cluster monofiletico che comprende la maggior parte dei cloni derivanti da virioni catturati con anticorpi verso marcatori monocitari, insieme ad un'inferiore diversità genetica di questa quasispecie virale, può suggerire due ipotesi: (i) il virus proveniente dai monociti possiede proprietà distintive nella regione gag, considerata comunemente non coinvolta nel determinare il tropismo cellulare del virus; (ii) i pazienti hanno avuto una stessa fonte di infezione ed il virus che si replica nei monociti presenta un'evoluzione più lenta rispetto al resto del virus replicante. Se confermati in un numero maggiore di pazienti, tali dati potrebbero essere rilevanti sia da un punto di vista patogenetico che terapeutico.

Contributo: 40F.21

STUDI DEGLI EFFETTI DI TAT SULLE FUNZIONI CELLULARI IN CORSO DI INFEZIONE DA HIV-1 NEL MODELLO DEL TOPO TRANSGENICO VBK/TAT

Egidio Brocca Cofano* (*Università degli Studi di Ferrara*); Rebecca Voltan (*) ; Arianna Castaldello (*) ; Chiara Triulzi (*) ; Giuseppe Altavilla** (*Università degli Studi di Padova*); Antonella Caputo (**)

Background: I topi transgenici per tat di HIV-1, in cui tat è espresso in tutti gli organi e tessuti, rappresentano un modello sperimentale che ricapitola diverse patologie che si manifestano in corso di AIDS, soprattutto per quanto attiene alle lesioni simili al sarcoma di Kaposi, alla displasia epatica e ai linfomi. Perciò questo sistema sperimentale sembra prestarsi bene allo studio degli effetti extravirologici della proteina Tat, cioè gli effetti che Tat esercita sulle funzioni cellulari, e per stabilire l'efficacia di strategie terapeutiche. Un primo obiettivo è di acquisire informazioni sui meccanismi attraverso cui la proteina Tat sia responsabile della maggiore incidenza ed aggressività del KS in corso di AIDS. Inoltre, si intende stabilire l'efficacia di possibili strategie terapeutiche volte al controllo del KS, come l'uso di anticorpi anti-Tat e, in collaborazione con la dr. L. Tondelli (CNR, Bologna), di nuove nanosfere core-shell come mezzo per veicolare ed aumentare la biodisponibilità di inibitori delle proteasi, per i quali è già stata dimostrata attività antiangiogenica, anti-tumorale e la capacità di ridurre la frequenza di comparsa del KS14c. Un secondo obiettivo è studiare il ruolo e il meccanismo oncogeno di Tat. Verranno eseguiti esperimenti per stabilire se la displasia epatica e l'iperplasia della cute indotte da Tat aumentino la predisposizione alla tumorigenesi nel fegato e nella cute. Sia nell'esperimento basato sulla displasia epatica che nell'esperimento mirante alle lesioni cutanee, l'uso di carcinogeni iniziatori (DENA, uretano e DMBA) e di carcinogeni promotori (TPA) permetterà di stabilire il meccanismo oncogeno di Tat. In particolare, sarà possibile determinare se Tat agisca cooperando all'effetto mutageno iniziatore, oppure se agisca con un effetto promotore e, infine, se sia responsabile della progressione delle neoplasie verso un più alto grado di malignità. Poiché tat è espresso nel cervello dei topi transgenici, un terzo obiettivo è l'impiego di questo modello per lo studio del ruolo di tat nella neuropatia associata a demenza che compare in corso di AIDS. Infine, per completare gli studi relativi al ruolo di HHV-8 nella patogenesi dei PEL sviluppati nel precedente progetto, utilizzeremo i topi transgenici per studiare il ruolo di Tat nella migrazione e adesione ai mesoteli delle cellule PEL.

Risultati: Si è iniziata la selezione di topi tat (maschi e femmine) per il trattamento cutaneo con DMBA e/o TPA. Gruppi di topi (n=60) transgenici e di animali di controllo di due mesi di età sono stati rasati con un rasoio elettrico e trattati con 200 µl/animale di una soluzione di acetone contenente DMBA alla concentrazione di 25 µg/200 µl. Altri gruppi di animali sono stati trattati con 200 µl per animale di una soluzione di acetone contenente TPA alla concentrazione di 10⁻⁴ molare. Il trattamento con DMBA verrà eseguito una volta sola, mentre il trattamento con TPA verrà eseguito due volte alla settimana per otto settimane. Per combinare e sommare l'effetto iniziatore del DMBA con l'effetto promotore del TPA, altri gruppi di animali verranno trattati con ambedue i carcinogeni, secondo lo schema descritto prima. La transizione dell'iperplasia cutanea e dei papillomi a carcinomi e dell'iperplasia endoteliale a un tumore simil-Kaposi è attesa fra il sesto e l'ottavo mese dopo l'inizio del trattamento.

Contributo: 40F.22

VALUTAZIONE DEL POTENZIALE RUOLO PATOGENETICO DELLE FORME EXTRACROMOSOMALI LENTIVIRALI IN CORSO DI INFEZIONE

Roberta Bona* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Laura Gillim** (*MSSM*); Pasqualina Leone (*); Zuleika Michelini (*); Mary Klotman (**); Barbara Ensoli (*); Andrea Cara (*)

Background: Durante le infezioni da HIV-1, in alternativa al provirus integrato responsabile della produzione della nuova progenie virale, alti livelli di DNA non integrato circolare (E-DNA) vengono accumulati nelle cellule infette. L'E-DNA si trova solo nel nucleo delle cellule infette e si può presentare sia nella forma con 1-LTR che nella forma con 2-LTR. L'E-DNA, ed in particolare la forma 2-LTR, è stato evidenziato *in vivo* negli individui infetti durante tutto il corso della malattia e nei modelli sperimentali di infezione animale *in vivo* e cellulare *in vitro*. Ad oggi alle forme E-DNA non è stata associata alcuna funzione patogenetica. Per contro, nel corso degli ultimi anni, si è visto che l'E-DNA è trascrizionalmente attivo *in vitro*. L'obiettivo centrale di questo progetto è quindi di analizzare il ruolo patogenetico delle forme E-DNA. A tal scopo, durante il primo anno di lavoro, abbiamo verificato: 1. La stabilità dell'E-DNA *in vitro*. 2. La possibilità che la proteina Nef trascritta dall'E-DNA diminuisca l'espressione del recettore di membrana CD4 nelle cellule infette.

Metodi: 1. Per la valutazione della stabilità dell'E-DNA *in vitro*, abbiamo utilizzato virus ricombinanti integrasi (IN) difettivi basati su HIV-1 che possiedono la caratteristica di compiere un unico ciclo di replicazione. Questi, in assenza di integrazione e quindi di successivi cicli di replicazione, hanno permesso di valutare, mediante PCR quantitativa, la presenza e la stabilità della forma E-DNA con 2-LTR nel corso del tempo sia in cellule in attiva divisione come i linfociti del sangue periferico (PBMC) che in cellule non replicanti come i macrofagi, in assenza di provirus integrato. 2. Per valutare se la proteina Nef trascritta dall'E-DNA diminuisce l'espressione del recettore di membrana CD4, come descritto per la proteina Nef prodotta dal provirus integrato, abbiamo infettato le cellule bersaglio (PBMC) con un virus ricombinante IN-difettivo nel cui genoma è stata inserita la sequenza codificante per GFP. Questo ha consentito di seguire nelle cellule infette la presenza dell'E-DNA contestualmente all'espressione di GFP, Nef e CD4 mediante citofluorimetria.

Risultati: 1. Mediante PCR real-time quantitativa, utilizzando virus IN difettivi ed IN competenti, siamo stati in grado di dimostrare che l'E-DNA è stabile in cellule non replicanti (macrofagi) fino a 21 giorni dall'infezione. Al contrario, in cellule in attiva replicazione (linfociti CD4+ attivati) l'E-DNA è stato rapidamente perso in coltura. 2. Utilizzando virus IN difettivi siamo stati in grado di dimostrare che Nef espresso dall'E-DNA diminuisce marcatamente l'espressione del CD4 di superficie su linfociti primari CD4+.

Conclusioni: Questi dati suggeriscono che la presenza di E-DNA di HIV-1 in individui infetti può essere dovuta alla continua produzione di nuove cellule infette o alla persistenza di E-DNA in popolazioni di cellule terminalmente differenziate. In questo contesto, la persistenza di E-DNA potrebbe essere una continua fonte di produzione di proteine virali come il Nef, con importanti conseguenze patogenetiche, cosa che acquista ulteriore importanza con lo sviluppo di farmaci anti-integrasi. Inoltre, benché studi precedenti abbiano dimostrato che l'E-DNA esprime trascritti virali e proteine, questa è la prima evidenza sperimentale di una proteina virale espressa in assenza di integrazione in grado di alterare il fenotipo di una cellula infetta.

Contributo: 40F/F

RUOLO DI HIV P17 NELL'ATTIVAZIONE DI COMPARTIMENTI CELLULARI BERSAGLIO DI HIV *IN VIVO* ED *IN VITRO*

Arnaldo Caruso* (*Università degli Studi di Brescia*); Elena Marini (*); Manuela Avolio (*); Simona Fiorentini (*)

Background: La replicazione di HIV è il risultato di una complessa interazione tra fattori virali e dell'ospite. Recentemente abbiamo dimostrato che la proteina di matrice p17 di HIV partecipa all'instaurarsi di una forte attivazione linfocitaria, accompagnata dalla produzione di molecole proinfiammatorie e che la sua azione viene svolta a seguito del legame ad un recettore cellulare. Si può quindi ipotizzare che p17 possa partecipare a creare un microambiente favorevole alla propagazione del virus. Obiettivo iniziale è stato quello di mettere a punto modelli cellulari e animali per poter studiare più in dettaglio i meccanismi molecolari che regolano le attività biologiche di p17.

Metodi: I monociti sono stati purificati tramite selezione positiva con biglie magnetiche anti-CD14 e trattati per 3-24 h con IFN-g o LPS (0.2-10 ng/ml) in presenza o assenza di p17. L'attivazione di fattori trascrizionali a seguito del trattamento con p17 (da 1 a 1000 ng) è stata valutata con saggi EMSA su estratti nucleari di cellule THP1 e DAUDI. La proliferazione cellulare ed il rilascio di citochine sono state valutate rispettivamente con saggi di incorporazione di 3H timidina ed ELISA. Il fenotipo cellulare è stato valutato con analisi citofluorimetrica.

Risultati: L'analisi fenotipica di cellule ottenute da una coorte di donatori ha evidenziato che il recettore di p17 (p17R) è espresso sui monociti circolanti e che la densità di p17R/cellula aumenta dopo attivazione con IFN-g o LPS. Il trattamento dei monociti con p17 determina un incremento dell'espressione di HLA-DR e CCR5, indicando un contributo della proteina virale all'attivazione monocitaria. Allo stesso modo, linee cellulari monocitarie (U937, THP1, MonoMac6) esprimono p17R, e tale espressione aumenta a seguito di stimoli attivatori. Studi volti a stabilire quali fattori trascrizionali sono attivati dopo trattamento con p17 hanno evidenziato che p17 attiva AP-1 e MEF-2 sia in linee monocitarie che B linfocitarie. Di recente abbiamo messo in evidenza che le cellule del sistema immunitario murino esprimono p17R e che le cellule murine rispondono al trattamento con p17 esogena in modo del tutto simile alle cellule umane. Questo risultato ci ha indotto a sviluppare un modello sperimentale di infezione con virus non patogeni per poter ottenere un'attivazione del sistema immunitario *in vivo*. Le cellule ottenute da animali infetti rispondevano "per se" al trattamento con p17 esogena. In particolare p17 induceva una forte risposta infiammatoria e permetteva una sopravvivenza ed espansione dei linfociti CD4 trattati con la proteina *in vitro*.

Conclusioni: I risultati fin qui ottenuti indicano che p17 esercita i propri effetti biologici su cellule monocitarie che esprimono costitutivamente p17R, e che il trattamento con p17 esogena induce in tali cellule segnali intracellulari attivatori a cui prendono parte molecole chiave come AP-1 e MEF-2. Inoltre, si può ipotizzare una sinergia d'azione tra p17 ed IFN-g volta ad incrementare l'attivazione monocitaria, l'espressione del corecettore CCR5 e, di conseguenza, la loro suscettibilità all'infezione di HIV. È da sottolineare che la produzione di IFN-g ed altre molecole infiammatorie ad attività pro-HIV da parte di cellule T ed NK è indotta da p17, che genera quindi un loop autocrino/paracrino capace di sostenere una forte stimolazione dei monociti. Studi preliminari dell'attività di p17 su cellule murine *in vitro* ed *in vivo* confermano inoltre la capacità di p17 di sostenere fenomeni infiammatori ed attivatori su cellule bersaglio di HIV.

Contributo: 40F.23

AZIONE CONCERTATA ELVIS: ESPRESSIONE SELETTIVA DELLA CHEMOCHINA CCL3L1 IN SOGGETTI LTNP CO-INFETTATI DA HIV-1 E HTLV-2

Elisabetta Pilotti* (*Università degli Studi di Parma*); Elisa Vicenzi** (*IRCCS San Raffaele, Milano*); Lisa Elviri (*); Umberto Bertazzoni (*Università degli Studi di Verona*); Guido Poli (**); Claudio Casoli (*)

Background: Nel mondo circa il 10-20% dei tossicodipendenti risultano co-infettati dai retrovirus HTLV-2 e HIV-1, ed in letteratura sono riportate evidenze clinico-epidemiologiche secondo le quali la co-infezione potrebbe indurre uno stato di long term non progressors (LTNP) nella malattia dell'AIDS. Al riguardo, il nostro gruppo di ricerca ha precedentemente dimostrato che nei soggetti co-infettati l'aumento nella sintesi della chemochina CCL3/MIP-1alfa indotta da HTLV-2 comporterebbe un blocco nell'infezione da HIV-1 sia in condizioni autologhe che allogeniche (Casoli *et al.*, Blood 2000). È noto che il gene CCL3/MIP-1alfa esiste in due forme non alleliche codificanti per le isoforme CCL3/LD78alfa e CCL3L1/LD78beta. CCL3L1, tra le CC-chemochine, mostra la più alta affinità di legame al corecettore CCR5 di HIV, ed il suo gene è variamente presente (da 0 a 6 copie per genoma diploide). Pertanto, il numero di copie e l'azione di Tax-2 potrebbero influenzare il livello di espressione della proteina matura e quindi la suscettibilità e la velocità di progressione della malattia da HIV. Alla luce di queste considerazioni abbiamo studiato il genotipo CCL3L1 e la sua espressione nelle colture di PBMC allestite da soggetti HTLV-2 infettati, sieronegativi per HIV a dispetto di molteplici esposizioni (multiply HIV-1 exposed-uninfected, HTLV-2/HIV-1ESN), in LTNP HIV-1/HTLV-2 co-infettati e LTNP HIV-1 mono-infettati.

Metodi: Il numero di copie del gene CCL3L1 e l'espressione del corrispondente mRNA sono stati determinati tramite real-time PCR. Le isoforme CCL3/LD78alfa e CCL3L1/LD78beta sono state purificate da colture di PBMC tramite una procedura cromatografica ed identificate attraverso spettrometria di massa. La produzione di CCL3/MIP-1alfa in risposta a stimolazione con l'antigene gp120-C5 di HIV è stata determinata tramite saggio E.L.I.S.A. La suscettibilità all'infezione da ceppi R5 o X4 di HIV dei PBMCs da soggetti HTLV-2 mono-infettati è stata valutata *in vitro* in presenza o in assenza di anticorpi anti-chemochine neutralizzanti.

Risultati: Nei soggetti studiati sono state stimate 2-3 copie di CCL3L1 per genoma diploide, non associabili ad una particolare condizione di infezione. In corso di infezione da HTLV-2, il livello dei trascritti CCL3L1 risultava maggiore rispetto a quello dei trascritti CCL3. In soggetti HTLV-2/HIV-1ESN ed LTNP HIV-1/HTLV-2 è stata riscontrata la presenza di entrambe le isoforme di MIP-1alfa; tra le due CCL3L1/LD78beta è risultata quella preferenzialmente prodotta (1.6 volte). È stato inoltre dimostrato che, fisiologicamente, le isoforme alfa e beta agiscono sotto forma di aggregati riducendo del 50% l'espressione del CCR5 sulla superficie dei monociti/macrofagi. *In vitro*, la produzione di CCL3/MIP-1alfa da parte dei PBMCs esposti al peptide C5 di HIV risultava aumentata di 3-5 volte rispetto ai controlli non stimolati. Nei PBMC di soggetti HTLV-2/HIV-1ESN, la scarsa efficienza di replicazione dei ceppi R5 di HIV-1 correlava con la presenza di MIP-1alfa, e non con quella di MIP-1beta o RANTES.

Conclusioni: Questi risultati supportano l'ipotesi che, in soggetti co-infettati, HTLV-2 possa interferire negativamente con l'infezione da HIV, ritardando la progressione dell'AIDS, attraverso l'aumentata sintesi della chemochina CCL3L1/LD78beta. Questo studio fornisce utili informazioni ai fini di valutare nuovi markers di protezione o progressione della malattia da HIV-1.

Contributo: 40F.24

REGOLAZIONE DELL'INTEGRAZIONE DI HIV-1 TRAMITE ACETILAZIONE DELL' INTEGRASI

Anna Cereseto* (*Scuola Normale Superiore, Pisa*); Lara Manganaro** (*ICGEB, Trieste*); Mariaelena Terreni (*); Antonio Fittipaldi (*); Maria Ines Gutierrez (**); Marina Lusic (**); Alessandro Marcello (**); Mauro Giacca (**)

Background: L'integrazione del cDNA di HIV-1 nel genoma cellulare è un passaggio fondamentale durante il ciclo replicativo del virus. Sebbene non siano state individuate sequenze specifiche di riconoscimento, sembra tuttavia che l'integrazione retrovirale sia favorita in regioni specifiche del genoma cellulare. Infatti una recente analisi ad ampio spettro dei siti preferenziali di integrazione ha messo in evidenza una stretta correlazione tra integrazione e zone del genoma ricche di geni trascrizionalmente attivi. È noto che la conformazione cromatinica, da cui dipende l'attività trascrizionale, viene regolata da diversi complessi proteici a cui appartiene una famiglia di enzimi noti come "Histone Acetyl Transferases" (HAT). L'acetilazione determina una diminuzione di affinità istoni/DNA con conseguente rilassamento della cromatina, che diventa quindi più accessibile ai fattori trascrizionali. Data l'associazione esistente tra struttura cromatinica regolata dalle HATs e trascrizione, e in base alle recenti evidenze che mettono in relazione geni trascrizionalmente attivi con l'integrazione virale, abbiamo formulato l'ipotesi di una possibile correlazione tra fenomeno integrativo e HATS.

Metodi: Produzione e purificazione di proteine ricombinanti wild-type o mutate tramite mutagenesi sito-diretta. Analisi *in vitro* di interazione tra proteine tramite saggi di GST pull-down. Analisi *in vivo* di interazione tra proteine tramite co-immunoprecipitazione o FRET. Saggi di acetilazione *in vitro* e *in vivo*. Saggi di UV-crosslink DNA binding. Saggi di attività catalitica di IN (strand-transfer e 3' end-processing). Saggi di replicazione virale e analisi di integrazione virale tramite Alu-PCR o PCR di 2-LTR.

Risultati: In questo studio è stata condotta un'analisi di interazione tra l'integrasi (IN) di HIV-1 e HATs cellulari. Esperimenti svolti *in vitro* hanno dimostrato che, tra le HATs analizzate, p300 è in grado di legare l'IN. L'interazione tra queste due proteine è stata verificata *in vivo*, in cellule trasfettate dove, tramite analisi FRET, IN e p300 sono risultate interagire in maniera diretta. Questi dati ci hanno suggerito di verificare l'attività acetilasica di p300 su IN come substrato; saggi di acetilazione hanno in effetti dimostrato che l'IN viene acetilata da p300 in tre lisine localizzate nel dominio carbossi-terminale. Poiché questo dominio è coinvolto nel legame non specifico dell' IN al DNA, abbiamo condotto saggi di affinità di legame di IN al DNA e saggi di attività enzimatica. Questi esperimenti hanno chiaramente dimostrato che l'acetilazione dell'IN determina un aumento di affinità di legame al DNA e un conseguente aumento dell' attività enzimatica *in vitro*. Il ruolo della acetilazione dell'IN nell'ambito del ciclo replicativo di HIV-1 è stato poi verificato utilizzando un clone virale (BRU) in cui le tre lisine bersaglio di acetilazione sono state sostituite con residui di arginina non acetilabili. Il clone virale mutato non è in grado di replicare probabilmente a causa di un blocco a livello integrativo, come dimostrato dalla sensibile diminuzione di quantità di provirus e dal parallelo aumento di forme circolari non integrate.

Conclusioni: Questo studio dimostra per la prima volta che l'IN va incontro a modificazione post-traduzionale. L'acetilazione regola strettamente la funzionalità dell'IN in quanto l'assenza di tale modificazione diminuisce sensibilmente l'efficienza integrativa determinando un completo blocco replicativo.

Contributo: 40F.25

ANALISI FUNZIONALI DELLE PROTEINE REV DI HIV E P13II DI HTLV-1

D. M. D'Agostino* (*Dip. di Scienze Oncologiche e Chirurgiche, Università degli Studi di Padova*); M. Silic Benussi (*) ; E. Scarponi (*) ; I. Cavallari (*) ; D. Saggioro (*Azienda Ospedaliera di Padova*); F. Meggio** (*Dip. di Chimica Biologica., Università degli Studi di Padova*); L. Pinna (**); O. Marin (**); P. Bernardi (*Dip. di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova*); L. Chieco Bianchi (*) ; V. Ciminale (*)

Background: Scopo del presente progetto è la definizione dei meccanismi di azione di (a) Rev, un'attivatore post-trascrizionale di HIV-1; e (b) p13II, una proteina di HTLV-1 a localizzazione mitocondriale. (a) Benchè Rev contenga numerosi siti di fosforilazione potenziali, il significato di questa modificazione nella regolazione della sua attività non è chiaro. Partendo da studi precedenti che hanno identificato le serine 54 e/o 56 come possibili bersagli della proteina chinasi PKC, abbiamo analizzato le proprietà di mutanti di Rev in cui questi residui sono stati sostituiti con alanina (nonfosforilabile) o con acido aspartico che, presentando una carica netta negativa, simula la fosforilazione. (b) I nostri studi hanno dimostrato che la proteina p13II si localizza a livello della membrana interna mitocondriale e ne controlla la permeabilità al K⁺. È stato riportato che anche Vpr si localizza, in parte, nei mitocondri dove induce alterazioni del 'permeability transition porè (PTP) mitocondriale che portano al rilascio di citocromo c ed apoptosi. Al fine di confrontare i meccanismi di azione di p13II e Vpr, abbiamo iniziato un'analisi comparativa della loro localizzazione ed dei loro effetti sulle diverse attività mitocondriali.

Metodi: (a) I mutanti di Rev (Ser54A/56A; Ser54D/56D) sono stati confrontati per le seguenti proprietà: (i) attività, mediante trasfezioni di cellule con un costrutto reporter Rev-dipendente; (ii) traffico intracellulare (importo-esporto nucleare); (iii) legame all'RNA, utilizzando un saggio 'RNA pull-down'; (iv) la capacità di formare multimeri, mediante un saggio basato sulla ridistribuzione di Rev-GFP; (v) stabilità, mediante marcature 'pulse-chase'. (b) Vpr e p13II sono state analizzate mediante (i) saggi *in vitro* su mitocondri isolati al fine di testare permeabilità di membrana, potenziale e consumo di O₂; in tali saggi sono state utilizzate versioni 'full-length' e troncate di p13II e Vpr; (ii) saggi su cellule trasfettate con vettori di espressione di p13II e Vpr e saggi di proliferazione, apoptosi e tumorigenicità.

Risultati: (a) I risultati più interessanti sono stati ottenuti con i mutanti acidi: in particolare, Rev54D56D, del tutto inattivo, mostra difetti a livello sia di legame all'RRE che di traffico intracellulare e stabilità. Al contrario, la sostituzione delle due serine con alanine comporta una modesta diminuzione di attività e legame all'RRE. (b) I risultati finora ottenuti indicano che attraverso il controllo della permeabilità mitocondriale a K⁺, p13II controlla il potenziale di membrana ed il consumo di O₂. A livello cellulare p13II esercita un effetto antiproliferativo, proapoptotico ed antitumorale. Sebbene alcune di queste siano analoghe a quelle di Vpr, gli effetti sulle funzioni mitocondriali sembrano in parte distinti.

Conclusioni: (a) Nel complesso, i nostri dati sottolineano l'importanza delle serine 54 e 56 per la modulazione della funzione di Rev e suggeriscono che la loro fosforilazione sia sottoposta a controllo sia positivo che negativo. (b) I dati finora ottenuti suggeriscono che p13II possa funzionare da regolatore negativo della proliferazione e sottolineano una connessione fra le funzioni mitocondriali ed il controllo del bilancio crescita/morte cellulare.

Contributo: 40F.26

DINAMICA DELL'EVOLUZIONE INTRA-OSPITE E FITNESS DI VARIANTI DEL GENE ENV DI HIV-1

Massimo Clementi* (*Università Vita-Salute, Milano*); Filippo Canducci (*); Enzo Boeri (*); Martina Mammarella (*); Roberto Burioni (*)

Background: La dinamica dell'evoluzione intra-ospite della quasispecie di HIV-1, caratterizzata da una continua generazione di varianti, competizione e selezione ha fornito un'interpretazione del potenziale adattativo virale ed è legata alle progressione della malattia e alla risposta ai vaccini e alle terapie. Lo studio è stato progettato al fine di valutare le caratteristiche bio-molecolari dell'evoluzione intra-ospite di HIV-1 e porle in relazione ai correlati di progressione. È noto che l'analisi dell'evoluzione intra-ospite di HIV-1 può avvantaggiarsi dell'assegnazione di specifici tratti fenotipici ai profili di sequenza genomica (studi sequenza-funzione). Ciò è tanto più rilevante se si pensa che, mentre alcune sequenze possono occupare solo uno spazio fenotipico ristretto rispetto al loro teorico potenziale evolutivo (poiché queste varianti non possiedono una sufficiente capacità replicativa; mutanti letali), per altre esiste una maggiore tolleranza funzionale.

Metodi: Lo studio descritto si è basato sull'applicazione di tecnologie finalizzate ad evidenziare, in parallelo all'analisi evolutiva delle sequenze virali, tropismo, fitness e potenziale patogeno relativo di varianti virali replicative e non, sia selezionate *in vivo*, sia generate *in vitro* mediante mutagenesi. Sono stati generati vettori virali ricombinanti per la valutazione sequenza-funzione di specifiche sequenze virali del gene env (V3 e gp41, rispettivamente), della proteasi e della trascrittasi inversa.

Risultati: A) È stato programmato un sistema di valutazione di sequenze della regione V3 realizzando due nuovi vettori molecolari che consentono clonaggio ed espressione di sequenze esogene in contesti gp120 a tropismo, rispettivamente, R5 o X4. L'uso di tali vettori ha consentito anche di valutare la dinamica replicativa *in vitro* dei virus ricombinanti ottenuti. Questa strategia è stata applicata allo studio di sequenze ottenute da campioni di soggetti infettati o mutagenizzate *in vitro*, documentando non solo il prevalente ruolo di V3 nel determinare il tropismo, ma anche il ruolo di singole mutazioni o associazioni di esse nel favorire una migliore fitness relativa.

B) È stata affrontata la selezione di env operata dalle terapie anti-retrovirali che non riconoscono nei prodotti di tali sequenze un bersaglio. In tale studio, è stata valutata l'evoluzione delle varianti in soggetti pediatrici in fallimento terapeutico, con e senza recupero immunologico. I dati hanno suggerito un importante ruolo dell'incremento di pressione selettiva sulle strutture virali nel primo caso.

C) È stato analizzato l'impatto sulla fitness virale delle mutazioni selezionate da enfuvirtide, un inibitore della fusione virale. Nello studio è stato costruito un vettore in grado di accettare sequenze esogene codificanti gp41. I dati riguardanti soggetti in fallimento terapeutico hanno indicato soltanto una modesta ed incostante modificazione della fitness virale nelle varianti resistenti.

Conclusioni: È stata applicata una strategia di tipo sequenza-funzione alla valutazione di varianti del gene env di HIV-1 selezionate in diverse condizioni al fine di ottenere informazioni sui determinati dell'evoluzione intra-ospite e sulle sue conseguenze bio-patogenetiche. I dati hanno indicato l'influenza di specifiche mutazioni o associazioni di esse sulla fitness virale relativa, consentendo di approfondire il ruolo dell'evoluzione virale nel contesto dei rapporti virus-ospite.

Contributo: 40F.27

CORRELATI GENETICI DI PROTEZIONE NELL'INFEZIONE DA HIV

Mara Biasin* (*Università degli Studi di Milano*); Giuliana Magri (*); Daria Trabattoni (*); Luca Piacentini (*); Masaaki Miyazawa (*Kinki University, Osaka*); Mario Clerici (*)

Background: In tutti i gruppi a rischio per infezione da HIV sono stati individuati soggetti che nonostante l'assenza di genoma virale e di qualsivoglia traccia di infezione presentano sia una sostenuta risposta cellulo-mediata HIV-1-specifica che IgA mucosali HIV-1 neutralizzanti. Tuttavia, sinora, tutti i tentativi di correlare lo stato di resistenza all'infezione da HIV-1 con eventuali polimorfismi genetici si sono dimostrati infruttuosi.

Metodi: Sulla base dei risultati ottenuti studiando un modello murino di infezione retrovirale, in cui un gene che mappa sul cromosoma 15 è stato correlato alla produzione di anticorpi neutralizzanti, abbiamo genotipizzato 42 soggetti italiani esposti non infetti (ESN) in 13 loci altamente polimorfici che mappano sul cromosoma 22, sintenico al cromosoma 15 murino. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli di altrettanti soggetti HIV-1 infetti e con soggetti sani di controllo (HC).

Risultati: I risultati ottenuti hanno rivelato che: 1) solo gli ESN presentano un'interruzione del linkage disequilibrium sul cromosoma 22, nel segmento 22q13.1; 2) la presenza di una diversa distribuzione allelica dei marcatori presenti nel segmento 22q13.1, osservata negli ESN, sembrerebbe correlare con la presenza di un locus dominante in grado di conferire resistenza all'infezione da HIV-1. Al fine di identificare e caratterizzare questo gene potenzialmente protettivo, tramite REALTIME PCR abbiamo quindi valutato i livelli e i possibili induttori di espressione di APOBEC3G e APOBEC3F, inibitori endogeni della replicazione di HIV-1, che mappano sul cromosoma 2;

2. I risultati hanno mostrato che l'IFN α , ma non IL-2, è in grado di stimolare l'espressione di APOBEC3G e APOBEC3F, indipendentemente dall'IL-15 e che l'infezione da HIV-1 aumenta l'espressione di APOBEC3F ma non quella di APOBEC3G. Inoltre, abbiamo osservato come l'espressione basale e IFN α -indotta di APOBEC3G e APOBEC3F sia significativamente più elevata negli ESN rispetto agli altri gruppi in studio.

Conclusioni: Questi risultati non solo contribuiscono a chiarire i meccanismi di regolazione di APOBEC, ma suggeriscono anche la presenza di un background genetico distintivo negli ESN e la possibilità che, nell'uomo, elevati livelli di espressione di APOBEC3G e APOBEC3F possano correlare con la resistenza alle infezioni da retrovirus.

Contributo: 40F.28

MODEL OF NEONATAL VACCINATION FOR THE PREVENTION OF MOTHER TO CHILD TRANSMISSION OF HIV/AIDS IN WEST AFRICA

Vittorio Colizzi* (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Giulia Cappelli** (*CNR*); Massimo Amicosante (*); Carla Montesano (*); Maurizio Mattei (*); Graziana Palmieri (*); Manuela Grassi (**); Giuseppe Pontrelli (*); Francesca Mariani (**); Carlo Federico Perno (*); Massimo Andreoni (*); Guido Castelli (*Ospedale Bambin Gesù, Roma*); Paolo Rossi (*); Roberta D'Arrigo (*); Henri Chenal (*CIRBA*); Jacques Simpure (*Ospedale San Camillo, Roma*)

Background: The prevention of mother to child transmission of HIV is representing one of the major problems in the developing countries. The anti-retroviral treatment has diminished the transmission during the perinatal period but not the breast-feeding transmission. Further, for economic, hygienic and cultural problems it is difficult to replace the breast feeding with bottle-feeding. In order to develop a model of neonatal vaccination adapts for developing countries with high incidence of mother to child transmission of HIV, we have analysed the adjuvant role of the BCG vaccine, obligatory in all the developing countries for the prevention of the tuberculous meningitis, in increasing T-cell response against HIV epitopes.

Methods: CD4 and CD8 T-cell epitopes have been identified by: HIV-1 sequencing in HIV+ subjects of West Africa (Burkina Faso, Ivory Coast, Camerun), HLA typing in the same population, peptide binding motif analysis and analysing the response against the single peptides by ELISpot and cytofluorimetric analysis in HIV subjects. Further, we have produced a recombinant BCG (rBCG) expressing HIV-1 multi-epitopic peptides (MEP) on the scaffold of *M. tuberculosis* Ag85B secreted protein. The helping effect of BCG in developing an antibody or a T-cell response against exogenous proteins and peptides (HBV and HIV) has been studied in two animal models (rat and *Macaca fascicularis*). It is in course of approval by the Ethical Committee of the Policlinico "Tor Vergata" a phase-1 study on adult healthy volunteers in which it will be given a vaccine arranged with BCG and HBV without alum in order to produce the proof of concept that BCG determine an increase of the response against co-delivered antigens.

Results: The prevalent HIV-1 present in the West Africa population is the recombinant A/G strain. Based on HLA alleles present in the target population we have selected 24 epitopes designed in the most conserved area of the HIV-1 GAG (11 peptides), NEF (4), TAT (4), VPR (2) and VPU (3) proteins. Both CD4+ and CD8+ T-cells were able to recognise the selected peptides suggesting their potential role as immunogens. The adjuvant effect of BCG in developing an immune response against HIV peptides has been evaluated in rat and *Macaca fascicularis*. The co-delivery of peptides and BCG determined a significantly increase of antibody and T-cell response against HIV-1 peptides. Human study confirming this adjuvant effect of BCG will be performed by using a vaccine arranged with BCG and HBV without alum. Finally, we started the production of a rBCG as a stable reagents to be used in the future to deliver BCG and exogenous epitopes. MEP sequence containing 3 HIV-1 antigens was designed using the BCG-codon usage and inserting spacer aminoacids to avoid the formation of junctional epitopes. We are currently screening the rBCGs for the presence of the plasmids and for the expression of the r-polypeptides at RNA and protein level.

Conclusions: The results obtained so far suggest the adjuvant role of BCG that, as vaccine given in the first day of life, is of particular interest in developing countries for increasing the immune response against exogenous antigens such as HIV, particularly for controlling the mother to child transmission due to breast feeding.

Grant: 40F.29

AZIONE CONCERTATA “ELVIS”: POLIMORFISMI DI FAS E FASL NEI PAZIENTI HIV+

Milena Nasi* (*Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia*); Marcello Pinti (*); Cristina Mussini** (*Azienda Policlinico di Modena*); Vanni Borghi (**); Roberto Bugarini (*); Roberto Esposito (*); Leonarda Troiano (*); Andrea Cossarizza (*)

Background: La velocità di progressione della malattia e la risposta alla terapia antiretrovirale variano in maniera notevole da individuo ad individuo; una mole sempre maggiore di dati suggerisce che l'assetto genetico dell'ospite giochi un ruolo fondamentale sia nella suscettibilità all'infezione, sia nella progressione verso l'AIDS. Per questo motivo, negli ultimi anni, una crescente attenzione è stata rivolta allo studio del ruolo di polimorfismi di geni dell'ospite, implicati nella patogenesi dell'infezione da HIV e nella progressione della malattia. Nell'ambito della Azione Concertata “E.L.V.I.S.” - Evaluation of LTNP: Viroimmunological Italian Study, il presente studio intende quindi valutare l'importanza del background genetico nei pazienti HIV+ classificati come “long term non progressor” (LTNP). Dato che è ben noto il coinvolgimento dell'apoptosi nella deplezione dei linfociti T CD4+, abbiamo iniziato a studiare i polimorfismi genetici del sistema Fas/FasL. Si sottolinea che è già iniziato il censimento e l'identificazione dei LTNP presenti nelle varie casistiche afferenti ad E.L.V.I.S., necessario per la raccolta di campioni di DNA da tali soggetti.

Metodi: Ci sono due polimorfismi nel promotore del Fas posti in posizione -670 e -1377 rispetto al sito di inizio della traduzione, all'interno della regione enhancer e silencer del promotore stesso. Per il FasL, ci sono due polimorfismi all'interno degli introni 2 e 3 in posizione -124 e 169. Utilizzando diverse metodiche molecolari basate sulla PCR (RFLP, ASA e ACRS) abbiamo studiato 131 pazienti caucasici naive per HAART. Sono stati considerati i fattori clinici, la conta dei CD4+, il viral load (al momento dell'inizio della terapia, dopo 3 e 6 mesi), il tipo di terapia al momento dell'assunzione e l'aderenza. I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi a seconda se, insieme a due NRTI, assumessero un inibitore delle proteasi (PI, 97 pazienti) o un inibitore della trascrittasi inversa non nucleosidica (NNRTI, 34 pazienti). È stata quindi confrontata la distribuzione dei polimorfismi di Fas e FasL tra i soggetti HIV+ e 136 soggetti sani.

Risultati: Nei pazienti HIV+ naive e nei controlli gli alleli di Fas e FasL erano in equilibrio di Hardy-Weinberg. È stata però osservata una differenza statisticamente significativa nella distribuzione del polimorfismo FasL-169, dove l'allele “delT” è molto meno rappresentato nei soggetti HIV+ rispetto ai soggetti sani. Quando vengono presi in considerazione i singoli alleli dei geni Fas e FasL non si osservano differenze statisticamente significative nei livelli di immunoricostruzione dei pazienti trattati, mentre la combinazione di alcuni polimorfismi influenza in modo significativo la produzione di CD4+ e il decremento del viral load. Pazienti con un genotipo combinato di FasL IVS2nt169 T/delT e IVS3nt-124 A/A mostrano i risultati terapeutici migliori in termini di recupero di CD4+. Pazienti con un genotipo combinato di Fas -670 A/G e -1377 A/G sono associati ad una buona risposta alla terapia come recupero di CD4+ ma anche come diminuzione del viral load.

Conclusioni: La combinazione di alcuni alleli di Fas e FasL, più che la loro singola presenza, sembra influenzare i livelli di immunoricostruzione a seguito dell'assunzione della HAART. Lo studio dei LTNP permetterà quindi di capire l'importanza di questi geni nella mancata o minor progressione dell'infezione.

Contributo: 40F.30

INTERAZIONE VIRO-IMMUNOLOGICA E PROFILO MOLECOLARE DI HIV NEI BAMBINI HIV-INFETTI CON DIVERSA RISPOSTA ALLA TERAPIA ANTIRETROVIRALE

Marisa Zanchetta* (*Dip. di Scienze Oncologiche e Chirurgiche, Università degli Studi di Padova*); Sarah Walker (*MRC, Clinical Unit, London*); Nicoletta Burighel (*); Domenico Bellanova (*); Carlo Giaquinto (*Dip. di Pediatria, Università degli Studi di Padova*); Anita De Rossi (*)

Background: Benché la terapia antiretrovirale (ART) controlli efficacemente la replicazione di HIV, una quota discreta di bambini rimane persistentemente viremica. Inoltre un pool di cellule HIV-infette persiste nonostante un prolungato periodo di aviremia. Oltre che dal reservoir di cellule latentemente infettate, il pool di cellule HIV-positive può essere influenzato da altre variabili, inclusi livelli di residua infezione virale e produzione di nuove cellule bersaglio di infezione. Scopo del presente studio è stato valutare l'interazione tra immunoricostruzione e declino del reservoir di cellule HIV-infette e studiare il profilo molecolare di HIV nei bambini con diversa risposta alla terapia.

Metodi: Gli studi sono stati effettuati in due coorti: A) 33 bambini naive per terapia e seguiti per 96 settimane dall'inizio di ART; B) 29 bambini scelti retrospettivamente in base alla risposta alla terapia: 14 (responders), dopo un declino dell'HIV-RNA plasmatico sotto i livelli di rilevanza, si sono mantenuti aviremici per tutto il follow-up (48 mesi) e 15 (nonresponders) sono rimasti persistentemente viremici, nonostante cambio di terapia in alcuni. Campioni sequenziali di cellule di sangue periferico sono stati studiati per output timico, mediante analisi quantitativa dei TREC, e per dinamica virale cellula-associata, mediante analisi quantitativa dell'HIV-DNA, dell'HIV-mRNA unspliced (HIV-US) e dell'HIV-mRNA multiply spliced (HIV-MS).

Risultati: I risultati ottenuti nella corte A hanno dimostrato che al baseline i livelli di cellule HIV-infette sono correlati ai livelli di TREC ($p=0.02$). Durante ART il declino delle cellule HIV-infette è inversamente correlato all'aumento dei TREC ($p=0.002$); questa relazione è influenzata dallo stato di viremia e, per uno stesso aumento di TREC, il declino di HIV-DNA è maggiore durante le fasi aviremiche che quelle viremiche. I risultati ottenuti nella corte B hanno dimostrato che al baseline non esiste nessuna differenza significativa tra i due gruppi con diversa risposta alla terapia per quanto concerne età, numero di linfociti CD4, livelli di HIV-DNA; tuttavia i rapporti MS/DNA e MS/US sono significativamente superiori nei nonresponders che nei responders ($p<0.05$). Durante ART, il declino degli HIV-MS e HIV-US è già significativamente superiore nei responders rispetto ai nonresponders dopo 3 mesi di terapia ($p<0.03$), mentre il decremento dell'HIV-DNA diventa significativamente superiore nel primo rispetto al secondo gruppo solamente dopo 6 mesi di ART ($p=0.01$). Dopo 3 mesi di terapia gli HIV-MS permangono nel 50% dei campioni dei nonresponders, mentre sono assenti nella quasi totalità dei responders, a suggerire in questi la mancanza di nuovi cicli replicativi.

Conclusioni: I risultati indicano che in corso di ART l'immunoricostruzione durante le fasi viremiche influenza negativamente il declino delle cellule HIV-infette. Inoltre, la risposta iniziale alla terapia è influenzata dai livelli di infezione produttiva al baseline: un minore rapporto tra cellule HIV-produttori/cellule HIV-infette al baseline è associato ad una più rapida scomparsa durante ART di nuovi cicli di infezione virale e a un più rapido declino nel numero di cellule HIV-produttori. Il declino del pool totale di cellule HIV-infette è determinato dalla risposta iniziale alla terapia e dai livelli di immunoricostruzione.

Contributo: 40F.31

ATTIVITÀ ANTI-HIV-1 DI PEPTIDI SINTETICI CHE RIPRODUCONO SEQUENZE NATURALI O MODIFICATE DELLA CHEMOCHINA SDF-1°

Monica Dettin* (*Università degli Studi di Padova*); Antonella Pasquato (*); Fabiana Buniotto (*); Marisa Zanchetta (*); Emilia Caputo (*); Carlo Di Bello (*); Anita De Rossi (*)

Background: L'entrata del virus HIV-1 nelle cellule bersaglio richiede l'interazione di gp120 con CD4 e un recettore per chemochine, CCR5 o CXCR4. Il ligando naturale di CXCR4 è SDF-1 che viene prodotta in due forme: SDF-1a (68 aa) e SDF-1b (72 aa), le quali differiscono nei 4 residui aggiuntivi C-terminali presenti in SDF-1b. È stato dimostrato che SDF-1a e SDF-1b inibiscono l'infezione di cellule CD4+ da HIV-1 X4. Nonostante numerose pubblicazioni indichino nel tratto N-terminale il dominio necessario l'attività antivirale, SDF-1b risulta possedere attività inibitoria doppia rispetto a SDF-1a(1-67). Il presente studio valuta il ruolo della porzione C-terminale di SDF-1 nell'attività antivirale. Abbiamo precedentemente dimostrato che il tratto C-terminale di SDF-1b (sequenza 51-72 denominata SDF-1bT) possiede attività inibitoria mentre l'analogo tratto della chemochina SDF-1a (sequenza 51-68 denominata SDF-1aT) non presenta attività. Nel presente contributo riportiamo le proprietà anti-HIV di analoghi di SDF-1bT: (i) recanti modifiche puntiformi ai residui 72 o 70 e 72 (Nle72SDF-1bT e D-Phe70Nle72SDF-1bT) o (ii) condensati alla sequenza 1-13 di SDF-1 addizionata o meno di un residuo di Met N-terminale (SDF-1bNC e Met-SDF-1bNC).

Metodi: Peptidi. I peptidi sono stati ottenuti per SPPS. Linee cellulari. Sono state utilizzate cellule U87 MG e U373 CD4+ e CXCR4+ o CCR5+. Virus Sono stati utilizzati i ceppi virali IIIB e Bal quali prototipi dei virus X4 e R5. Saggi di infezione. Dopo 24 h su piastra, le cellule sono state preincubate con i peptidi a concentrazioni scalari per 30 min a 37 °C e quindi infettate con i ceppi IIIB o Bal (10000 pg/well). In altri esperimenti il virus è stato preincubato con i peptidi. Dopo 48 ore dall'infezione, le cellule U373 sono state lisate e si è determinata la concentrazione proteica e l'attività b-galattosidasi. Per alcuni pozzetti il livello di infezione è stato determinato tramite PCR qualitativa e quantitativa.

Risultati: I saggi eseguiti con virus preincubato con i diversi peptidi non hanno evidenziato alcuna attività inibitoria dei peptidi. I saggi di infezione su cellule U87 MG pretrattate con i peptidi hanno dimostrato:-capacità del peptide SDF-1bT di ridurre del 69% l'infezione a 25 uM;-effetto inibitorio dei peptidi SDF-1bNC e Met-SDF-1bNC rispettivamente del 67% e del 63% a 25 uM;-inattività degli analoghi Nle72SDF-1bT e D-Phe70Nle72SDF-1bT nelle medesime condizioni. I saggi sulle cellule U373 pretrattate con i peptidi confermano l'andamento evidenziato nei saggi su cellule U87 MG. L'analisi PCR qualitativa evidenzia che tutti i campioni, trattati o non trattati con i vari peptidi, eccetto il controllo negativo, sono stati infettati dal virus. L'analisi PCR quantitativa mediante tecnica real-time ha evidenziato una riduzione di copie virali nei campioni trattati con i peptidi eccetto quelli recanti modifiche puntiformi. Nessuno dei peptidi inibisce l'entrata di virus R5 in cellule CCR5+. Gli esperimenti dose-risposta eseguiti con SDF-1bNC e Met-SDF-1bNC dimostrano che:-a concentrazioni 25 uM e 50 uM l'attività inibitoria è paragonabile a quella di SDF-1bT.-i peptidi risultano meno tossici di SDF-1bT ed il loro uso a 100 uM dà una riduzione dell'infezione virale >95%.

Conclusioni: I peptidi SDF-NC e Met-SDF-NC inibiscono l'infezione di ceppi X4 in cellule CD4+ CXCR4+. Il residuo C-terminale di Met in SDF-1bT ha un ruolo fondamentale nell'inibizione.

Contributo: 40F.32

RUOLO DI CD38, H4/ICOS E FAS NELL'INFEZIONE DA HIV

Thea Bensi* (*Università degli Studi del Piemonte Orientale, Novara*); Andrea Savarino** (*Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Riccardo Mesturini (*) ; Annalisa Chiocchetti (*) ; Umberto Dianzani (*)

Background: Il progetto si propone di studiare il ruolo svolto da CD38, H4/ICOS e FAS nell'infezione da HIV, partendo dall'osservazione che gp120 induce la loro interazione laterale con CD4. 1) Abbiamo dimostrato che un peptide corrispondente alla sequenza 51-74 di CD38 inibisce l'infezione *in vitro* a concentrazioni nanomolari. Il progetto si propone la costruzione di un derivato di questo peptide che conservi l'attività antivirale e sia dotato di una maggiore stabilità biologica.

2) Abbiamo dimostrato che nel corso dell'infezione *in vivo* l'espressione di H4/ICOS correla con la viremia con un picco nella infezione primaria, crollo in seguito al successo della terapia HAART e risalita nell'AIDS conclamato. Altri autori hanno dimostrato che la stimolazione di H4/ICOS inibisce l'infezione cellulare *in vitro*. Il progetto si propone di valutare l'attività funzionale di H4/ICOS sui linfociti umani per chiarirne il meccanismo dell'azione antivirale.

3) FAS è coinvolto nello spegnimento della risposta immunitaria. Abbiamo dimostrato che suoi difetti funzionali ereditari determinano una ipereattività del sistema immunitario e sono frequenti nei soggetti "long-term non progressors" (LTNP). Il progetto vuole identificare alterazioni geniche responsabili di questi difetti.

Metodi: 1) Il peptide CD38(51-74) è stato coniugato con PEG e se ne è quindi valutata l'attività *in vitro* sull'infezione e sull'attivazione linfocitaria.

2) Si è valutato l'effetto della stimolazione di H4/ICOS da parte del suo ligando B7h sull'attivazione dei linfociti T CD4+ vergini.

3) Si è analizzato il segnale trasmesso da Fas in portatori di forme gravi del difetto di Fas (affetti dalla sindrome autoimmune linfoproliferativa) per identificare geni candidati su cui si sono quindi ricercate alterazioni responsabili del difetto.

Risultati: 1) Abbiamo messo a punto un protocollo che ha permesso di ottenere un'elevata efficienza di PEGilazione del peptide. Esperimenti *in vitro* dimostrano che il peptide PEGilato purificato mantiene l'attività antivirale e (come quello non coniugato) è privo di attività citotossica e immunomodulatoria (non induce la produzione di IL1, IL2, IL4, IL6, IL10, TNF-a, IFN-g da parte di PBMC sia quiescenti che attivati).

2) Abbiamo dimostrato che la stimolazione di H4/ICOS nei linfociti T CD4+ vergini umani potenzia la secrezione di IFN-g, IL10 e TGFb. Utilizzando citochine esogene e loro antagonisti abbiamo dimostrato che l'azione di ICOS si sviluppa attraverso un feedback positivo tra IL2 and IFNg, il cui effetto dipende dal microambiente citochinico. Infatti alti livelli di IL2 favoriscono la secrezione di TNFa, IFNg, IL10 e TGFb, mentre alti livelli di IFNg favoriscono la secrezione di IL2 e TNFa, ma inibiscono quella di IL10 e TGFb.

3) Abbiamo identificato varianti di 3 geni che possono contribuire al difettoso funzionamento di Fas: a) particolari aplotipi del gene di osteopontina (citochina proinfiammatoria); b) mutazioni del gene di caspasi-9; c) mutazioni del gene di perforina.

Conclusioni: 1) Il peptide CD38(51-74) PEGilato potrà essere utilizzato per valutarne l'efficacia antivirale *in vivo* nell'infezione del topo huSCID

2) L'identificazione delle citochine prodotte dalla stimolazione di H4/ICOS permetterà di valutare (utilizzando specifici antagonisti) se la secrezione di queste citochine abbia un ruolo nell'attività antivirale della molecola

3) L'identificazione di 3 nuovi geni coinvolti nel difetto funzionale di Fas permetterà di ricercare alterazioni di questi geni nei soggetti LTNP portatori del difetto.

Contributo: 40F.33

EFFETTI DIRETTI E MEDIATI DI HIV *IN VITRO* SU CELLULE IMPLICATE IN PATOLOGIE HIV-ASSOCIATE

Caterina Serra* (*Dip. di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari*); Adriana Biolchini (*) ; Luca Carboni (*) ; Alessandra Mei (*) ; Vito Astone (*) ; Giuseppe Delogu (*) ; Giuseppe Mameli (*) ; Maurizio Federico (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Sergei Kotenko (*Dept. Biochem. Mol. Biol., New Jersey Med School, Newark*); Antonina Dolei (*)

Background: Con la maggior sopravvivenza dei pazienti emergono nuove patologie HIV-associate (nefropatia, cardiopatia, enteropatia e patologia ossea), avvalorando la nostra tesi da 15 anni sul ruolo in AIDS dei tessuti solidi. Nostro OBIETTIVO sono gli effetti di HIV su CELLULE ADERENTI (diretta e a distanza, mediati da tat o nef, induzione di citochine immunosoppressive, attivazione di virus coinfezionanti), in relazione soprattutto alla PATOLOGIA OSSEA e la PATOLOGIA RENALE

Metodi: Abbiamo studiato: 1. Effettori diretti di HIV (Nef e tat esogeni) o indiretti (citochine proinfiammatorie) su fibroblasti e cellule epiteliali, +/- HIV, e valutato la regolazione di molecole cellulari e la replicazione di HIV M- o T-tropico.

2. Gli effetti di HIV T- ed M-tropico sui geni regolatori del rimodellamento osseo (RANKL/OPG) *in vitro*, valutandone l'espressione basale e in corso di infezione, in cellule circolanti e in cellule epiteliali di varia origine.

3. Le interazioni di HIV con altri agenti pre- o co-infezionanti: a) il poliomavirus BKV, in cellule epiteliali renali in co-infezioni BKV-HIV o trattamenti con tat o citochine HIV-inducibili, in parallelo a PBMC di soggetti sani che presentino o meno nelle loro PBMC geni di BKV, valutando l'espressione di geni precoci (Tag) e tardivi (Vp1) di BKV; b) MSR/V, un retrovirus endogeno della famiglia HERV-W, con attività gliotossica e superantigenica

4. Gli effetti dell'interferon di tipo III IFN λ 1, recentemente identificato, che sembra particolarmente presente in cellule epiteliali, sulla replicazione di HIV e sull'espressione di geni cellulari rilevanti per le patologie di interesse.

Risultati: rNef esogeno, specie miristilato, entra in fibroblasti e cellule epiteliali in forma attiva, con capacità di trasduzione del segnale e di modulazione di citochine e chemiochine. Si ha espressione basale di RANKL e OPG in cellule circolanti e in svariate cellule epiteliali. In PBMC HIV determina una significativa stimolazione dell'espressione di RANKL (pro-osteoclastogenesi), ma non di OPG, gene protettore dell'osso. PBMC BKV(-) e cellule renali si infettano con BKV; in cellule trattate con HIV, tat e TNF α si ha aumentato accumulo di trascritti di BKV; l'effetto della replicazione di HIV dipende dalla permissività delle varie cellule renali ad HIV. Al contrario, in PBMC di soggetti con MSR/V circolante, l'infezione con HIV o tat esogena interferiscono con MSR/V. Il pre-trattamento con IFN λ causa maggior adsorbimento di HIV, correlabile all'aumentata espressione di CCR5 e di CXCR4 (si ha anche una iperespressione di OPG/RANKL). In cellule epiteliali e C8166 in presenza di questo IFN si ha più HIV intracellulare. Dati da confermare indicano che il rilascio da cellule T in infezione acuta è inibito, mentre quello di HIV-epiteliale in cellule HeLa persistentemente infette è aumentato.

Conclusioni: Su cellule dei tessuti solidi vi possono essere effetti a distanza mediati da nef rilasciato dalle cellule infette. La stimolazione preferenziale di RANKL suggerisce la possibilità di un effetto diretto di HIV sul rimodellamento osseo. HIV attiva BKV (tramite tat e citochine HIV-inducibili), ma interferisce con MSR/V. Gli effetti di IFN λ su HIV e sulle cellule aprono un campo nuovo, di cui vanno chiarite le possibili implicazioni patogenetiche e terapeutiche.

Contributo: 40F.34

RUOLO DELLA PROTEINA NEF DI HIV-1 NELL'EVASIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

Nicoletta Casartelli* (*Ospedale Bambin Gesù, Roma*); Marina Potestà (*); Paolo Rossi (*Ospedale Bambin Gesù - Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Margherita Doria (*); Francesca Neri (*); Cristina Cerboni (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*)

Background: Mediante lo screening funzionale di varianti della proteina Nef di HIV-1 derivate da pazienti con diversa modalità di progressione, ci proponiamo di identificare le caratteristiche strutturali e funzionali di Nef che hanno un ruolo cruciale nella patogenesi della malattia e che rappresentano target ottimali nella terapia e prevenzione dell'AIDS. Proseguendo lo studio già intrapreso (sull'attività di downmodulazione di CD4 e HLA-I), intendiamo studiare la capacità delle varianti Nef di stimolare l'attivazione cellulare e l'infettività di HIV-1. Inoltre, avvantaggiandoci del vasto numero di proteine Nef derivate dai pazienti, vogliamo studiare il ruolo di Nef nell'evasione delle difese immunitarie dell'ospite. La downmodulazione di HLA-I dovuta a Nef impedisce il riconoscimento della cellula infettata da parte dei linfociti T citotossici ma, allo stesso tempo, rende la cellula suscettibile alla lisi mediata dalle cellule natural killer (NK) la cui citotossicità è normalmente inibita dall'espressione di HLA-I sulla cellula target. Per il virus quindi, una strategia di evasione efficace sarebbe quella di impedire l'espressione sulla cellula infettata di molecole che innescano le funzioni effettrici delle NK. Questo aspetto è stato studiato analizzando il ruolo di Nef sull'espressione di molecole strutturalmente simili ad HLA-I (le proteine MICA, B e ULBP1-4) che funzionano da ligandi per NKG2D, un potente recettore attivatorio presente su tutte le cellule NK.

Metodi: Costruzione e caratterizzazione di virus HIV-1 ricombinanti esprimenti le varianti Nef derivate dai pazienti (test di infettività e di replicazione). Saggi chinasi *in vitro* con le varianti Nef. Analisi della capacità di legare *in vitro* cofattori noti (p.es. Hck) delle varianti Nef espresse come proteine di fusione GST-Nef. Analisi al FACS dell'espressione dei ligandi di NKG2D in cellule esprimenti Nef di NL4-3 (wt e mutata in vari domini conservati) o varianti Nef derivate dai pazienti ed in cellule infettate con HIV-1 wt o Nef-. Test di citotossicità standard (rilascio di ⁵¹Cr) con linee NK (effettori) e cellule esprimenti Nef (target).

Risultati: Abbiamo identificato nuovi residui aminoacidici di Nef importanti per la funzione ed approfondito l'analisi di alcuni domini noti della proteina. In particolare, fenotipi difettivi o iperattivi dell'attività di downmodulazione di HLA-I e di stimolazione dell'infettività virale riscontrati nelle proteine Nef derivate dai pazienti sono associati, rispettivamente, a sostituzioni o duplicazioni del dominio ricco di proline (PxxP) di Nef. La funzione del dominio PxxP sull'espressione di HLA-I è indipendente dalle due proline centrali che sono invece necessarie per la stabilità della proteina e altre attività di Nef (attivazione della chinasi PAK, legame a domini SH3). Inoltre abbiamo dimostrato che, durante l'infezione da HIV-1, la cellula aumenta l'espressione in superficie di alcuni ligandi di NKG2D (MICA, ULBP1 ed ULBP2). Tuttavia, Nef downmodula queste molecole, anche in assenza di altre proteine virali, con conseguenze importanti quali l'inibizione della lisi mediata dalle cellule NK. Infine abbiamo dimostrato che questa nuova attività biologica è indipendente dalle altre funzioni di Nef ed è conservata nelle proteine Nef derivate dai pazienti.

Conclusioni: I nostri dati rinforzano l'importanza di Nef nell'evasione della risposta immunitaria dell'ospite contro il virus HIV-1 e sottolineano la necessità di trovare terapie mirate all'inibizione delle funzioni di Nef.

Contributo: 40F.35

STUDIO DELLA RISPOSTA IMMUNE UMORALE ANTI-TAT IN PAZIENTI CON INFEZIONE DA HIV-1 IN DIVERSO STADIO DI PROGRESSIONE CLINICA ED IN SOGGETTI NON PROGRESSORI (LTNP) (AC ELVIS)

V. Fiorelli* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); F. Ensoli** (*IRCCS S. Gallicano, Roma*); A. Tripiciano (*); A. Scoglio (*); B. Collacchi (*); M. J. Ruiz Alvarez (*); C. Giannetto (*); A. Fazio (*); G. Paniccia (*); A. Arancio (**); F. Stivali (**); V. Francavilla (*); O. Longo (*); S. Buttò (*); G. Rezza (*); B. Ensoli (*); (Tat Multicentric Study Group)

Background: Una piccola frazione (1-2%) di pazienti con infezione da HIV definiti “non progressori a lungo termine” (LTNP), è caratterizzata da uno stato clinico asintomatico e bassi livelli di replicazione virale per anni, in assenza di terapia antiretrovirale. Sebbene i correlati di protezione non siano noti, si ritiene che questi includano risposte immuno-effettrici efficaci contro componenti virali chiave. Tra i prodotti genici virali, Tat è una proteina regolatoria espressa precocemente durante l’infezione ed indispensabile per una efficiente replicazione virale ed infettività, che riveste un ruolo chiave nella patogenesi dell’AIDS e neoplasie associate. Studi nell’uomo e in modelli animali suggeriscono che una risposta immune contro Tat possa svolgere un ruolo protettivo nei confronti della progressione della malattia. Sulla base di queste evidenze abbiamo condotto uno studio dell’immunità umorale anti-Tat in pazienti in diverso stadio di progressione della malattia ed in individui LTNP

Metodi: Lo studio è stato condotto su un campione di 302 pazienti con infezione da HIV che includeva 30 individui LTNP ed in 132 soggetti sieronegativi a basso rischio di infezione. La risposta immune umorale contro il Tat è stata determinata sulla scorta di un algoritmo basato sull’utilizzo di due diverse metodiche ELISA ad elevata specificità utilizzando la proteina Tat nativa (HTLV-IIIb, clone BH-10). Epitopi B-cellulari sono stati identificati mediante peptidi parzialmente sovrapposti derivati dalla sequenza lineare di Tat (BH-10 clone; aa 1-86)

Risultati: La prevalenza di anticorpi anti-Tat (IgM e IgG) corrisponde al 17.2% del campione in esame (52/302). IgG ed IgM anti-Tat erano presenti nel 13.2% and 6.9% dei pazienti, rispettivamente, mentre erano assenti nei 132 individui sieronegativi analizzati. La presenza di IgG o IgM anti-Tat è più frequente in pazienti in stadio A (21.8%) rispetto al gruppo in stadio B (6.1%), o C (4.1%) ($p=0.002$). Tra i pazienti in stadio A i soggetti LTNP mostravano una tendenza, non statisticamente significativa, ad una più elevata prevalenza di anticorpi anti-Tat rispetto agli individui in stadio A da meno di 7 anni (20% contro 15.7% per le IgG; 10% contro 7.2% per le IgM). L’analisi (anti-Tat IgG ed IgM) in pazienti stratificati in base alle conte dei CD4 nel sangue periferico mostra una prevalenza del 20.2% nei soggetti con $CD4+ >200/mL$ contro il 7.2% nel sottogruppo con $CD4+ <200/mL$ ($p=0.01$). La presenza di anticorpi anti-Tat di tipo conformazionale appare prevalente in tutti i gruppi di pazienti, come indicato dall’assenza (nel 55% dei sieri anti-Tat positivi) o dai bassi titoli (<200) degli anticorpi epitopo-specifici nel 64.5% dei sieri anti-Tat positivi

Conclusioni: Questi risultati indicano che la produzione di anticorpi anti-Tat è significativamente associata con lo stadio asintomatico dell’infezione e che individui LTNP mostrano una elevata prevalenza di anticorpi anti-Tat. Gli studi attualmente in corso sono diretti ad una esplorazione longitudinale, comparativa, dell’immunità umorale e cellulare contro Tat ed altre proteine regolatorie (Nef) dello HIV-1

Contributo: 40F.36

VALUTAZIONE DEL NUMERO E DELLA DISTRIBUZIONE DELLE CELLULE DENDRITICHE PLASMOCITOIDI IN LINFONODI DI PAZIENTI CON LINFOADENOPATIA HIV-ASSOCIATA

Fabio Facchetti* (*Università degli Studi di Brescia*); Maurilio Ponzoni** (*Ospedale San Raffaele, Milano*); Francesca Gentili (*); Claudio Doglioni (**); William Vermi (*); Silvano Sozzani (*); Simona Marrelli (*); Amerigo Santoro (*); Guido Poli (*Università Vita-Salute, Milano*)

Background: Le cellule dendritiche plasmocitoidi (PDC) rappresentano una popolazione cellulare intensamente studiata negli ultimi anni soprattutto per la loro intrinseca capacità di produrre elevate quantità IFN-alfa. Ciò supporta un ruolo chiave delle PDC nella risposta all'HIV. Le PDC circolano nel sangue periferico e migrano agli organi linfoidi sfruttando specifici meccanismi molecolari. È dimostrato che il numero delle PDC circolanti è severamente ridotto nei pazienti infettati dal virus dell'HIV e questa riduzione correla con la gravità di malattia. Abbiamo verificato l'ipotesi che tale riduzione sia correlata ad anomalie di distribuzione e reclutamento linfonodale.

Metodi: Il materiale di studio è stato raccolto e catalogato in forma di banca tissutale. È stata selezionata una casistica comprensiva di materiale fissato proveniente da 50 casi (linfoadenopatia HIV-associata) e 50 controlli (linfoadenopatia in pazienti HIV-). Sono state effettuate 5 sezioni per ogni blocchetto tissutale successivamente immunocolorate per CD68 e per CLA/Heca452. Per la valutazione quantitativa sono stati selezionati in media dieci campi ad alto ingrandimento (HPF) di area extranodulare, visualizzati in microscopia ottica e le immagini catturate mediante fotocamera digitale. L'analisi quantitativa è stata effettuata mediante il software *analySIS Image Processing*.

Risultati: Nella prima fase si è effettuata una valutazione della distribuzione delle PDC. Nel gruppo di controllo le PDC sono state riscontrate prevalentemente nelle aree extra-nodulari, in associazione alle venule ad endotelio alto, disposte come singoli elementi o in forma di aggregati. Lo studio comparativo del gruppo dei casi HIV+ non ha mostrato anomalie di sede e distribuzione delle PDC rispetto ai controlli. Nella seconda fase si è proceduto ad una valutazione quantitativa delle PDC. Sulle medesime sezioni immunocolorate per CD68 e CLA/Heca452 è stata effettuata una conta delle PDC. La stima del valore medio di PDC nei casi HIV+ è risultata di 55.14 cellule/HPF. Tuttavia è stata riscontrata una enorme variabilità del numero di tali cellule con presenza di linfonodi depleti di PDC (< 5 PDC/HPF) contrapposti a linfonodi estremamente ricchi (>100 PDC/HPF). Nel tentativo di correlare tale variabilità a parametri noti di gravità della malattia, è stata effettuata una raccolta anamnestica dei dati clinico-laboratoristici al momento della biopsia nodale. Di tutti i pazienti è stato possibile recuperare i dati relativi a: i) conta dei CD4 nel sangue periferico, ii) stadio di malattia e presenza infezioni opportunistiche, iii) terapia antiretrovirale in atto e iv) carica virale. Sono attualmente in corso le analisi statistiche.

Conclusioni: Le fasi preliminari del presente studio hanno messo in evidenza come le PDC siano normalmente distribuite nei linfonodi di pazienti HIV+. La valutazione quantitativa nodale ha evidenziato una variabilità numerica di tale popolazione. Tale variabilità può rivestire significato biologico e clinico-prognostico e pertanto essere correlata ad altri parametri indice di gravità di malattia o risposta alla terapia.

Contributo: 40F.37

CELLULE DENDRITICHE TRATTATE CON TAT INDUCONO L'ATTIVAZIONE E LA PROLIFERAZIONE DI LINFOCITI AUTOLOGHI

Emanuele Fanales Belasio* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Sonia Moretti (*); Maria Rosaria Pavone Cossut (*); Filomena Nappi (*); Iole Macchia (*); Aurelio Cafaro (*); Barbara Ensoli (*)

Background: La proteina Tat di HIV-1 riveste un ruolo fondamentale nella infezione virale in virtù della sua capacità di promuoverne la trascrizione dei geni e la replicazione. Tale proteina è infatti prodotta nelle fasi iniziali dell'infezione e viene rilasciata nell'ambiente extracellulare, esercitando la sua azione sulle cellule circostanti. Recentemente il nostro gruppo ha dimostrato che Tat, a dosi nano/picomolari, entra selettivamente in cellule dendritiche di origine monocitaria (MDDC), ed è in grado di indurne la maturazione, aumentandone la capacità di presentazione antigenica e la produzione di citochine e chemochine in grado di attivare la risposta linfocitaria (Fanales-Belasio *et al.*, *J. Immunol.* 2002). È quindi ipotizzabile che, in corso di infezione, Tat possa esercitare un effetto di "recruitment" ed attivazione delle cellule del sistema immunitario, in particolare i linfociti CD4+, aumentandone in tal modo la suscettibilità alla replicazione virale e la migrazione a livello linfonodale, facilitando la diffusione del virus nell'organismo.

Metodi: MDDC sono state ottenute da monociti dal sangue periferico di donatori sani, purificati per mezzo dell'impiego di biglie paramagnetiche coniugate con anti-CD14 e separazione in campo magnetico. I monociti purificati sono stati messi in coltura in presenza delle citochine GM-CSF ed IL-4 per 6 giorni e l'avvenuta differenziazione è stata valutata mediante analisi morfologica in microscopia ottica e mediante l'analisi fenotipica, in citofluorimetria a flusso, dei caratteristici marcatori di superficie (CD1a, HLA-DR, CD80, CD83, CD86). Le MDDC CD1a+ sono state quindi transitoriamente trattate con HIV-1 Tat in forma nativa, con Tat mutata nella regione cisteinica (cys22 Tat) priva di attività biologica, o con LPS in qualità di controllo positivo. Dopo 18 ore di coltura le MDDC sono state messe in coltura in presenza di linfociti autologhi e su queste cellule sono state determinate nei giorni successivi: a) l'espressione superficiale delle molecole C25, CD69 e HLA-DR, marcatori dell'attivazione cellulare, e dei recettori chemochinici CCR5 e CXCR4 mediante colorazione con anticorpi monoclonali specifici ed analisi in citofluorimetria a flusso; b) la proliferazione per mezzo del saggio di incorporazione della 3H-timidina triziata.

Risultati: Le colture di MDDC CD1a+ sono state adeguatamente messe a punto con apprezzabile grado di purezza (>95%) e differenziazione. In MDDC da differenti donatori il trattamento transitorio con Tat nativa, ma non con cys22 Tat, è risultato indurre maturazione cellulare, come evidenziato dall'aumento dell'espressione delle molecole di superficie HLA-DR, CD83 e CD86. Le MDDC trattate con Tat, ma non quelle trattate con cys22 Tat, hanno indotto dopo 24, 48 e 72 ore nei linfociti autologhi, in particolare T CD4+ e CD8+, un marcato aumento della molecola CD69, ma non delle molecole HLA-DR e CD25. Sulle stesse cellule è stata inoltre riscontrata una modica riduzione dell'espressione di CXCR4 ma non di CCR5. In maniera simile le MDDC trattate con Tat, ma non quelle trattate con cys22 Tat, hanno indotto un aumentata risposta proliferativa dei linfociti autologhi.

Conclusioni: I primi dati preliminari indicano che Tat nativa, ma non cys22 Tat, induce la maturazione delle MDDC ed un aumento dello stato di attivazione e della proliferazione dei linfociti autologhi, con una modica riduzione del co-recettore virale CXCR4. Sono in corso studi allo scopo di caratterizzare se l'attivazione linfocitaria possa essere associata ad un'aumentata suscettibilità all'infezione da HIV-1.

Contributo: 40F/G

MECCANISMI ALLA BASE DEGLI EFFETTI PATOGENETICI DI NEF SUI MACROFAGI

Eleonora Olivetta* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Gianna Fiorucci (*CNR, Roma*); Massimo Sanchez (*) ; Vincenza Chiantore (*) ; Maurizio Federico (*)

Background: La proteina regolatoria Nef di HIV-1 svolge importanti funzioni sia riguardo l'infettività virale che nello sviluppo della patogenesi AIDS. I nostri studi si sono rivolti essenzialmente a definire il ruolo svolto da Nef nel modello dei macrofagi primari umani. Queste cellule svolgono un ruolo decisivo nello sviluppo della malattia, sia da un punto di vista virologico, dato che sono parte del "virus reservoir" resistente alla HAART, sia da un punto di vista patogenetico, considerato che reagiscono all'infezione da HIV rilasciando fattori solubili in grado di reclutare ed attivare linfociti CD4 non infetti, nonché di indurre apoptosi nei linfociti CD8. A partire dalla definizione del "pattern" trascrizionale indotto nei macrofagi da Nef, abbiamo poi indagato gli effetti di Nef su funzioni di immunità innata tipicamente svolte dalle cellule macrofagiche, quali il rilascio di radicali liberi. Infine, abbiamo analizzato gli effetti di Nef sulla replicazione di HIV, in particolare in riferimento agli effetti sull'apoptosi indotta da HIV nei macrofagi.

Metodi: L'analisi del profilo trascrizionale indotto da Nef sui macrofagi è stata compiuta per mezzo di tecniche di "microarray". Gli studi sugli effetti di Nef sull'immunità innata sono stati sviluppati usando cellule macrofagiche esprimenti Nef per induzione con analoghi di ormoni estrogeni. Infine, gli studi sugli effetti di Nef sull'apoptosi indotta da HIV-1 sono stati effettuati infettando macrofagi primari con preparazioni di HIV-1 pseudotipizzate con VSV-G e valutando l'apoptosi come funzione del legame con Annessina-V.

Risultati: I risultati ottenuti con "microarray assay" hanno dimostrato che i macrofagi rispondono alla presenza di Nef attivando in tempi brevi (2 ore) la trascrizione di un notevole numero di geni infiammatori, riducendo al contempo la trascrizione di buona parte dei geni per l'RNA ribosomale. Inoltre, abbiamo individuato i domini funzionali di Nef coinvolti nella risposta infiammatoria dei macrofagi. Riguardo l'effetto sul rilascio di superossidi, abbiamo dimostrato che Nef ha un effetto bifasico, aumentandone a tempi brevi (fino a 2 ore) il rilascio, il quale viene però completamente bloccato già a partire da 4-6 ore dall'espressione di Nef. Questo effetto è mediato da fattori solubili, e dati preliminari indicano che IL-10 contribuisca notevolmente al blocco del rilascio dei superossidi. Infine, abbiamo dimostrato che l'espressione di Nef protegge i macrofagi dall'apoptosi indotta da HIV-1 mediante l'inattivazione della proteina mitocondriale apoptotica Bad.

Conclusioni: Il quadro che emerge dagli studi di interazione tra Nef e macrofagi può essere sintetizzato affermando che Nef induce la trascrizione di una serie di geni infiammatori che, a loro volta, mediante meccanismi autocrini-paracrini, possono indurre il rilascio di fattori solubili in grado di influenzare significativamente sia la suscettibilità all'infezione da HIV dei linfociti, che di modulare funzioni di immunità innata. Inoltre, Nef contribuisce alla diffusione del virus inibendo l'apoptosi indotta da HIV nei macrofagi, permettendo così al virus di instaurare una infezione persistente che possa garantirgli una sopravvivenza ottimale all'interno dell'organismo infetto. Nel complesso, lo studio dei meccanismi sottesi all'azione di Nef assume sempre più grande rilevanza per lo sviluppo di terapie che possano sia inibire la diffusione del virus, che soprattutto contrastarne i danni immunologici.

Contributo: 40F/H

ANALISI DEI RIARRANGIAMENTI IGV NEL LINFOMI NON-HODGKIN ASSOCIATI A HIV: IMPLICAZIONI PER LA PATOGENESI DELLA MALATTIA

Daniela Capello* (*Dip. di Scienze Mediche, Università degli Studi del Piemonte Orientale, Novara*); Annunziata Gloghini** (*CRO, Aviano*); Eva Berra (*); Michaela Cerri (*); Davide Rossi (*); Clara Deambrogi (*); Umberto Tirelli (**); Antonino Carbone (**); Gianluca Gaidano (*)

Background: Nell'era HAART, i linfomi non-Hodgkin (NHL) rappresentano la neoplasia più frequente associata ad HIV. L'analisi dei riarrangiamenti dei geni codificanti le regioni variabili delle immunoglobuline (IGV) consente di approfondire la patogenesi della malattia e di identificare nuovi marcatori per la diagnosi e prognosi dei linfomi.

Metodi: L'analisi dei riarrangiamenti IGV delle catene pesanti (IGHV) e leggere k (IGKV) e lambda (IGLV) è stato effettuato in 90 HIV-NHL. I risultati ottenuti sono stati confrontati con 324 riarrangiamenti IGV ottenuti da 64 linfomi post-trapianto d'organo solido (PTLD) e 260 NHL aggressivi dell'ospite immunocompetente (IC-NHL) e con il repertorio delle cellule B normali.

Risultati: Un riarrangiamento funzionale IGHV è stato identificato in 85/90 (94%) HIV-NHL. Un riarrangiamento funzionale IGKV è stato identificato nel 45% dei casi (18/40) e IGLV nel 55% dei casi (22/40). L'identificazione di soli riarrangiamenti non funzionali è un evento raro in HIV-NHL (3/90; 3,3%) mentre è frequente nei PTLD (33/64; 52%; $p < 0,05$). L'ipermutazione somatica nei geni IGV è stata riscontrata nel 92% (83/90) di HIV-NHL. L'assenza di mutazioni IGV è significativamente associata ai linfomi plasmablastici del cavo orale (PBL; $p < 0,05$). Un utilizzo superiore all'atteso della famiglia IGHV4 è stato osservato in HIV-NHL (40/90; 44%; $p < 0,05$), ma non in PTLD (15/54; 28%), IC-NHL (83/260; 32%) e cellule B normali (25%). In particolare il gene IGHV4-34 è il più frequentemente riarrangiato in HIV-NHL (17/60; 28%; $p < 0,05$), mentre è raro in PTLD (4/54; 7,4%) e cellule B normali (4%). Al contrario, la famiglia VH3 è significativamente meno rappresentata in HIV-NHL (30/90; 33%; $p < 0,05$), rispetto a PTLD (26/54; 48%), IC-NHL (141/260; 54%) e cellule B normali (54%). L'analisi del profilo mutazionale dimostra che gli HIV-NHL (41/54; 76% e 24/54; 44%) hanno una maggiore tendenza a selezionare un anticorpo strutturalmente funzionale e ad elevata affinità antigenica rispetto ai PTLD (15/28; 54% e 9/28; 32%). La presenza di mutazioni ongoing, suggestive della presenza di eterogeneità intraclonale, è ristretta a 3/15 HIV-NHL.

Conclusioni: L'analisi dei geni IGV conferma la derivazione di HIV-NHL, ad eccezione dei PBL, da cellule B che hanno subito una reazione del centro germinativo (CG), suggerendo un importante ruolo della stimolazione antigenica nella patogenesi della malattia. Tale ipotesi è supportata dalla tendenza a conservare un B-cell receptor (BCR) strutturalmente funzionale e con elevata affinità antigenica nella maggior parte degli HIV-NHL. Al contrario, nei PTLD il ruolo dell'antigene e l'espressione di un BCR strutturalmente funzionale svolgono un ruolo secondario, come documentato dalla frequente inattivazione dei riarrangiamenti IGV tramite mutazioni "crippling". L'utilizzo preferenziale di alcuni geni IGV in HIV-NHL suggerisce che cellule B pre-neoplastiche polireattive e/o autoreattive siano coinvolte nella patogenesi della malattia. Infine, contrariamente a ciò che si osserva in IC-NHL, la presenza di eterogeneità intraclonale è un evento raro in HIV-NHL, suggerendo che gli HIV-NHL derivano da cellule B che hanno concluso la reazione del CG.

Contributo: 40F.38

CORRELATI IMMUNOLOGICI E VIROLOGICI DELLA CONDIZIONE DI NON PROGRESSIONE A LUNGO TERMINE DELL'INFEZIONE DA HIV-1

Massimo Galli* (*Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi di Milano*); Agostino Riva (*);
Luca Meroni (*); Daniela Mologni (*)

Background: L'azione concertata ELVIS è strutturata sull'azione integrata di dodici distinti gruppi partecipanti. Il principale obiettivo dell'AC ELVIS consiste nella conduzione di uno studio multicentrico in individui LTNP allo scopo di identificare meccanismi e/o correlati di protezione genetica, immunologica e virologica che possano fornire informazioni utili sia alla comprensione di meccanismi fisiopatologici della malattia che alla definizione di marcatori surrogati di protezione e/o di progressione clinica della malattia. Studi recenti hanno dimostrato l'associazione di una mutazione in posizione 77 (R77Q) nella proteina accessoria di HIV-1 Vpr con la condizione di long term non progression, ma i risultati sono ancora oggi controversi. CD150 (SLAM) agisce come corecettore per l'attivazione delle cellule T secondo una via CD28 indipendente. Il suo ruolo nelle risposte alle infezioni virali è determinante, agendo come potente induttore di una risposta di tipo TH1.

Metodi: Sono stati analizzati quattro gruppi di pazienti HIV-1 infetti: 15 Long Term Non Progressors (LNTN), 19 pazienti naïve per la terapia in progressione di patologia (Pr), 23 Slow Progressors in terapia con soli 2 farmaci inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI) ma in grado di controllare efficientemente l'infezione (SP) e 21 pazienti in terapia antiretrovirale caratterizzati da una patologia progressiva e da elevati livelli di carica virale (MEP). L'HIV-1 RNA è stato estratto dal plasma, la regione del gene Vpr è stata amplificata mediante nested PCR, clonata nel plasmide pGEM-T vector, quindi 10 cloni sono stati sequenziati.

Risultati: L'analisi della sequenza di Vpr ha mostrato una prevalenza statisticamente significativa della mutazione R77Q sia nei pazienti LTNP (86.7%) che nei pazienti SP (73.9%) in confronto ai pazienti Pr (42.1%) e MEP (38.9%). La significatività statistica fra i diversi gruppi è pari a $p=0.007$ (Test Chi-quadrato di Pearson). CD150+/CD4+ (%)CD150+/CD8+ (%)Controlli sani 28 15.3Early HAART A 17.3 26.9Late HAART B 7 3Naïve C 6 2LTNP 16.4 26.9A: CD4 HAART baseline >200/mm³B: CD4 HAART vaseline <200/mm³C: HAART naïve CD4<350/mm³.

Conclusioni: I nostri risultati confermano l'associazione della mutazione R77Q nel gene Vpr con la condizione di long term non progression. Inoltre anche i pazienti in grado di controllare efficacemente la replicazione virale preservando elevati livelli di linfociti T CD4+ mostrano una maggiore prevalenza della mutazione R77Q. Pertanto, tale mutazione potrebbe essere in grado di favorire la sopravvivenza delle cellule T *in vivo*, probabilmente interferendo con l'attività pro-apoptotica di Vpr. L'identificazione della mutazione puntiforme R77Q come marker di non progressione della malattia potrebbe risultare un parametro aggiuntivo per la scelta terapeutica, oltre alla conta linfocitaria T CD4 ed all'HIV-1 RNA. I dati preliminari sull'espressione di CD150 suggeriscono un effetto di HIV sull'omeostasi di CD150 la cui espressione sembra essere nettamente ridotta nei pazienti con severa immunocompromissione e difficilmente ripristinata nei soggetti che iniziano una terapia antiretrovirale con malattia avanzata. Gli elevati livelli di espressione mantenuti nei soggetti senza segni di progressione potrebbero svolgere un ruolo nel controllo naturale della malattia.

Contributo: 40F.39

MUTATIONS CONFERRING INTERCLASS ANTIRETROVIRAL DRUG RESISTANCE AND THEIR IMPACT ON HIV-1 REPLICATIVE CAPACITY

Fausto Baldanti* (*IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia*); Stefania Paolucci (*) ; Giulia Campanini (*) ; Giovanni Maga (*IGBE CNR, Pavia*); Giuseppe Gerna (*)

Background: HAART proved to be effective in suppressing HIV-1 replication, inducing increase in CD4+ T cell counts and improving the quality of life of HIV-1-infected individuals. However, long-term efficacy of HAART is impaired by the emergence of drug-resistant HIV-1 strains and cumulative drug toxicity effects. Central dogma in the analysis of antiviral drug resistance was that specific drugs would have lead to selection of HIV-1 strains with specific mutations (primary mutations) in reverse transcriptase (RT), protease (PR) and, more recently, fusogenic peptide (gp41), thus inducing reduction in both recognition and processing of drugs and, to a variable extent, enzyme activity, which could impair mutant virus replication. Other mutations (secondary mutations) would have accumulated during drug exposure with marginal or null effect on drug susceptibility, but inducing a regain of function by drug-resistant enzymes associated with an enhancement of viral replication.

Methods: Simplified assays for evaluation of drug resistance and replicative capacity of RT and PR recombinant HIV-1 strains were developed. In addition, recombinant wt and mutant enzymes were expressed *in vitro* for evaluation of catalytic efficiency.

Results: The combined use of these techniques allowed to identify a reduced susceptibility to stavudine (5-fold decrease) associated with mutations (Y181I/C and G190A/S/E) selected by exposure to non nucleoside RT inhibitors (NNRTI). HIV-1 recombinants with mutations at positions 181 and 190 of RT did not display reduced viral replication in cell culture. On the other hand, mutations Q145M/L in RT were associated with high level (>10-fold) resistance to all RT inhibitors, both nucleoside (NRTI) and NNRTI, as well as with a dramatic decrease in viral replicative capacity due to a very low catalytic activity of the mutated enzyme. In contrast, other amino acid changes at the same position (C/E) did not modify the phenotypic characteristics of recombinant HIV-1 strains. Interestingly, the very low frequency of Q145M/L mutations in HAART-treated patients (0.22% in a cohort of 3595 pts) suggests a greater impact of these mutations on viral fitness rather than a selective advantage of mutant strains in a drug-containing environment. Amino acids (aa) insertions are fairly rare mutations in RT and PR gene products. While ins69 in RT has been associated with multidrug resistance, insertions in PR are thought to be either polymorphisms with null effect or secondary mutations. The biologic effect of ins35G and ins35TN in the context of wt PR as well as PR with multiple resistance associated mutations was analyzed. The results obtained indicate that ins35G and ins35TN have null effect on resistance to protease inhibitors (PI), while differentially affect viral replication of PI-resistant HIV-1 strains. In fact, ins35G increased by about 1log₁₀ the replicative capacity of a PI-resistant recombinant strain with respect to the same strain without ins35G, while ins35TN reduced by about 2log₁₀ replication of a PI-resistant recombinant strain with respect to the corresponding ins35TN-lacking recombinant strain.

Conclusions: Combined evaluation of antiretroviral drug resistance and level of replicative capacity of drug-resistant HIV-1 strains might provide a new tool for long-term control of HIV-1 infection in HAART-treated patients. However, too little information is available from sequence data to infer a potential effect of genetic alterations on fitness of mutant strains.

Grant: 40F.40

RUOLO DI LIPIDI BIOATTIVI E DI MEDIATORI SOLUBILI RILASCIATI DA LINFOCITI T NEL CONTROLLO DELLA REPLICAZIONE DI HIV-1 IN MACROFAGI E CELLULE DENDRITICHE

Lucia Conti* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Manuela Del Cornò (*); Barbara Varano (*); Azzam Maghazachi (*Università degli Studi di Oslo*); Filippo Belardelli (*); Sandra Gessani (*)

Background: I macrofagi e le cellule dendritiche (DC) svolgono un ruolo determinante nella patogenesi dell'infezione da HIV-1 poiché sono attivamente coinvolte nel riconoscimento iniziale del virus, rappresentano importanti serbatoi cellulari a tutti gli stadi della malattia e contribuiscono alla trasmissione virale. Nonostante molti studi abbiano contribuito alla comprensione dei meccanismi molecolari e fattori cellulari/virali responsabili della regolazione della replicazione in questi tipi cellulari, alcuni aspetti della patogenesi sono ancora poco compresi. In questo studio, abbiamo analizzato il ruolo di lisofosfolipidi (LPL), fattori naturali di recente caratterizzati come importanti immunoregolatori, e di mediatori solubili rilasciati da linfociti T infettati da HIV-1 nella suscettibilità all'infezione e nel controllo della replicazione virale in macrofagi e DC.

Metodi: Monociti isolati dal sangue di donatori sani sono stati mantenuti in coltura per 6 giorni in assenza di fattori di crescita (MDM) oppure stimolati a differenziare in DC con GM-CSF e IL-4 in presenza o in assenza di terreno condizionato (LCM) da linfociti T infettati con HIV-1NL43. La replicazione virale nelle varie condizioni sperimentali è stata monitorata mediante determinazione dell'antigene gag intracellulare o rilasciato nel terreno di coltura. L'analisi fenotipica è stata effettuata per citofluorimetria.

Risultati: Abbiamo osservato che il trattamento di MDM con 2 diversi LPL, la sfingosina-1-fosfato (S1P) e l'acido lisofosfatidico (LPA) prima dell'infezione con HIV-1 R5 ne potenzia la replicazione virale. Questo effetto non è mediato dalla produzione di citochine note per la loro azione stimolatoria sull'infezione né da un aumento di recettori e corecettori responsabili per l'ingresso di HIV. Al contrario, i livelli intracellulari di gag sono significativamente ridotti in MDM trattati con LPL rispetto a cellule di controllo, suggerendo un ruolo dei lipidi bioattivi nel favorire il rilascio di HIV-1 dai macrofagi. In parallelo, abbiamo osservato che l'esposizione di monociti stimolati a differenziare in DC a LCM da linfociti T infettati con HIV X4, li rende suscettibili all'infezione con questo ceppo virale. Al contrario, l'esposizione al virus in assenza di LCM, la deplezione di virus infettivo o il trattamento con AZT, aboliscono l'accumulo intracellulare di gag in queste cellule. La comparsa di cellule gag-positive si osserva invece dopo riaggiunta di virus X4 infettante in LCM precedentemente depleti, correla con una maggiore espressione di CXCR4 ed è bloccata in presenza di AMD3100. Inoltre, abbiamo osservato che le DC esposte al virus nel corso del loro differenziamento mostrano una maggiore espressione di CD40, CD80 e CD86. Al contrario, dopo induzione della maturazione con LPS, l'attesa up-regolazione dell'espressione di queste molecole così come del CD83 è sensibilmente minore rispetto alle cellule di controllo non esposte al virus.

Conclusioni: Questi risultati indicano che nuovi fattori naturali, in aggiunta a citochine/chemochine, possono modulare la replicazione di HIV nei macrofagi. Inoltre, suggeriscono l'esistenza di relazioni reciproche tra DC e linfociti T e che fattori rilasciati nel microambiente da linfociti infettati con HIV possono regolare la suscettibilità delle DC all'infezione. Nel loro insieme, questi risultati indicano che la gamma di fattori e meccanismi coinvolti nelle interazioni virus/ospite è ben lontana dall'essere completa, sottolineando l'importanza di estendere le conoscenze su questo aspetto della patogenesi.

Contributo: 40F/I

MOLECULAR MECHANISMS CONTROLLING HIV-1 GENE EXPRESSION AND LATENCY

Marina Lusic* (*International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste*); Arianna Sabò** (*Scuola Normale Superiore, Pisa*); Alessandro Marcello (*) ; Lara Manganaro (*) ; Chiara Vardabasso (*) ; Antonio Fittipaldi (**); Maria Ines Gutierrez (*)

Background: After integration into the host genome, and independent of the integration site, the HIV-1 proviral DNA sequence is organized into a chromatin structure that modulates the viral transcription in an either positive or negative manner. Persistence of the virus as an integrated transcriptionally silent virus in specific cellular reservoirs allows the infected cells to escape from the current antiviral therapies. Activation of HIV-1 gene expression relies on essentially two nuclear events, chromatin remodeling at the LTR nucleosome and recruitment of elongation-competent RNA polymerase II complexes. Both these events are triggered by the presence of the HIV-1 Tat protein.

Results: One of the major goals of our research project is to define the molecular correlates that couple nucleosomal rearrangement at the HIV-1 LTR promoter with transcription processivity. In the context of this project, we have previously shown that activation of HIV-1 gene expression is concomitant with the acetylation of the nucleosomal histones, which we characterized in detail by quantitative chromatin immunoprecipitation (ChIP). Since protein acetylation results from the function of specific HAT (histone acetyltransferase) enzymes, we have now defined the kinetics of the recruitment of different cellular HATs (p300/CBP, GCN5, P/CAF) to the LTR. We found that these HATs are found with peculiar kinetics at the LTR, depending on the stimulus triggering transcription and on the presence of the Tat protein. Transcriptional processivity from the LTR promoter is primarily driven by the phosphorylation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II by the cellular CDK9 kinase, a protein that is activated through the interaction with Cyclin T1. The latter protein specifically binds Tat. We have observed that both Cyclin T1 and CDK9 reside in specific PML bodies inside the nucleus. Surprisingly, also the p300/CBP HAT is found in the same compartments. This colocalization to the same subnuclear structures might possibly indicate that HATs regulate HIV transcription not only at the level of chromatin organization, but also by modifying proteins of the basal transcriptional machinery. To assess this possibility, we studied the interactions of both Cyclin T1 and CDK9 with the HATs that bind the LTR, and found that the latter protein is specifically modified post-translationally concomitant with the interaction with one of these enzymes. To determine the functional relevance of these interactions, we are currently defining the kinetics of factor recruitment under various transcriptional conditions (in the presence of DRB and \pm amanitin) at the LTR as well as along the whole viral genome. Finally, we also wish to provide a dynamic picture of the events underlying HIV-1 transcriptional activation, by localizing the actual sites of transcription inside living cells. For this purpose we are constructing an HIV vector with a series of repetitions of the phage RNA binding protein MS2 binding site that will be used to identify the nuclear foci of mRNA synthesis by an MS2-EGFP construct.

Conclusions: Our results contribute to the understanding of the molecular events that underlie the activation of expression of HIV-1 in the infected cells and to the definition of novel cellular targets for therapeutic intervention.

Grant: 40F.41

ANALISI DEI LINFOCITI T NEL TIMO, NEL MIDOLLO OSSEO E NEL SANGUE E COLTURE DI CELLULE STROMALI DEL TIMO E DEL MIDOLLO OSSEO

Giulio Ferrario* (*Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi di Milano*); Paolo Vanelli** (*Ospedale L. Sacco, Milano*); Giulia Marchetti (*); Marina Saresella*** (*Fondazione Don Gnocchi, Milano*); Mara Biasin° (*Cattedra di Immunologia, Università degli Studi di Milano*); Carlo Antona (**); Pasquale Ferrante (**); Mario Clerici (°); Mauro Moroni (*); Andrea Gori (*)

Background: In corso di infezione da HIV, sono noti difetti funzionali dei linfociti T (LT) nel sangue: prevalenza di CD4+ HIV-specifici produttori di IFN- γ rispetto a quelli produttori sia di IL-2 che di IFN- γ ; prevalenza di CD8+ HIV-specifici di tipo central memory e pre-terminalmente differenziati con ridotta produzione di perforine, rispetto a quelli di tipo terminalmente differenziati con normale produzione di perforine. Non è noto se queste modificazioni siano presenti anche nei LT residenti nel timo e nel midollo osseo e se siano associate ad alterazioni della funzionalità dei LT stessi. Inoltre ancora poco studiate sono le cellule LT regolatorie (Treg) caratterizzate dalla capacità di inibire la proliferazione dei LT helper e CTL e il cui ruolo nell'infezione da HIV non è ancora noto.

Metodi: La ricerca analizza alcuni parametri del sistema immunitario cellulo-mediato: i) livelli di LT helper e CTL HIV-specifici, pattern citochinico (IL-2 e IFN- γ) e maturativo (CD45RA, CCR7, CD27), perforine, recettori per IL-2, IL-7 e IL-15; ii) livelli di Treg; iii) indici di neo-linfopoiesi (livelli di TRECs e di LT naive CD45RA+CD62L+). Questi parametri sono analizzati e comparati in tre differenti compartimenti anatomici: timo, midollo osseo e sangue, provenienti da adulti senza o con infezione da HIV, prelevati, previo consenso informato, in corso di intervento cardiocirurgico indicato per cardiopatie. Inoltre sono studiate le CST e CSMO e la loro capacità di produrre IL-7 e IL-15. I campioni biologici cellulari sono congelati e conservati in azoto liquido.

Risultati: Sono stati raccolti campioni cellulari di timo, aspirato midollare e sangue, provenienti da 6 donatori con infezione da HIV e da 7 donatori senza infezione da HIV. Il range di età dei donatori per i due gruppi è compreso tra 40 e 62 anni. Sono stati valutati preliminarmente i parametri citofluorimetrici dei pattern maturativi dei LT CD4+ e CD8+, sono stati ottimizzati la tipizzazione, il sorting mediante FACS dei Treg e la tecnica per la loro identificazione mediante l'analisi RT-PCR dell'mRNA di FoxP3. Gli esperimenti delle colture cellulari hanno consentito di individuare le migliori condizioni sperimentali e i terreni di coltura selettivi per la coltivazione delle CST e CSMO e la raccolta del surnatante per la valutazione della produzione di IL-7 e IL-15.

Conclusioni: Le analisi svolte fino ad ora hanno dimostrato la possibilità di identificare nel sangue, nel midollo osseo e nel timo una popolazione discreta di cellule Treg con fenotipo CD4+CD25⁺⁺. Tali cellule sono state isolate tramite FACS e identificate tramite RT-PCR specifica per mRNA di FoxP3. I livelli di mRNA di FoxP3 nei Treg, normalizzati per i livelli di mRNA di GPDH, sono risultati circa 30 volte superiori a quelli presenti nei LT CD4+CD25⁻. I test di coltivazione delle CSMO hanno consentito di espandere, su piastra, cellule morfologicamente indistinguibili dai fibroblasti-fibroblasti. I test di coltivazione delle CST hanno consentito di far proliferare su piastra CST epiteliali, caratterizzate dalla presenza di citocheratina, come evidenziato dalla analisi immunocitochimica.

Contributo: 40F.42

USE OF FILAMENTOUS BACTERIOPHAGES TO INDUCE CYTOTOXIC IMMUNE RESPONSE AGAINST HIV

Dina Mascolo* (*Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati Traverso", Napoli*); Piergiuseppe De Berardinis (*Istituto di Biochimica delle Proteine, CNR*); Giovanna Del Pozzo (*)

Background: Cytotoxic T lymphocytes have a central role in the successful control of immunodeficiency virus infection. In fact many lines of evidence implicate CD8 T lymphocytes in controlling HIV or SIV infection both during acute viremia and in long term non progressors patients. However, cytolytic T cell responses are not easily triggered by conventional vaccine formulations. We propose the use of filamentous bacteriophages as carrier molecule of immunodominant CTL epitopes for its ability to displaying multiple peptides capable of eliciting both T- helper and T cytolytic responses as well as B-cell responses. In fact these phage particles are able to enter both the MHC class I and class II compartments and stimulate both naive and memory cytolytic and helper T cell immune responses. We choose to display on the capsid surface multiple CTL epitopes from the identified and characterized immunodominant region of HIV RT and Gag proteins for an *in vivo* study using the Balb/c mouse model. We wish to demonstrate that the bacteriophage could be a good carrier for safe and effective poly-epitope HIV vaccine because it should be used as double epitope carrier or as mix of single different epitopes. Moreover by preparing small phages libraries displaying epitope mutations we plan to study the relevance of viral escape on CTL induction.

Methods: We used filamentous bacteriophages fd as carrier molecule of RT38-52 and Gag (p24 65-72 and p24 161-170) immunodominant epitopes. These are CTL epitopes able to be presented by H-2d molecule and allow us to perform *in vivo* mice immunization experiments to test the immunogenicity of phages constructs as single epitope preparations or as mix of phages expressing multiple CTL epitopes. The bacteriophage protein capsid is formed by 2700 copies of major protein (pVIII) that can display an elevated number of copies of one or two heterologous peptides at the N-terminal end. In fact, we have spent the first part of the project preparing the constructs and setting up the *in vivo* immunization protocol. Balb/c mice will be immunized twice by the single phages preparation or by phages mix and after 2 weeks they will be sacrificed and CD8+ T cell responses analyzed on the splenocytes by cytotoxicity test and ELISPOT assay.

Results: We have cloned the oligonucleotides sequences codifying for the CTL peptides in the phages constructs. The exogenous epitopes displayed on the phages capsid are: p24 65-73 (AMQMLKETI) and p24 159-168 (EPFRDYVDRF). The oligonucleotides sequences codifying for the peptides are cloned upstream the major coat gene VIII, in the fdAMPLAY88 vector digested with SacII-StyI enzymes. The hybrid bacteriophage virions have been harvested from *E.coli* culture medium, purified on CsCl gradient and analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The number of copies of pVIII displaying the exogenous peptides could be calculated from the relative yields of the various N-terminal sequences obtained by direct sequence analysis of the purified virions.

Conclusions: These preparations will be used to study the immunogenicity of the different epitopes either displayed on the same virion or by administration of a pool of phages expressing different CTL epitopes. The results will have relevant implications in: A) poly-epitope vaccination; B) immunogenicity of escape mutants.

Grant: 40F.43

ROGOLAZIONE DEL COMPLESSO P-TEFB, UN CO-FATTORE ESSENZIALE DELLA PROTEINA VIRALE TAT

Luigi Lania* (*Università degli Studi di Napoli*); Barbara Majello (*); Mimmo Turano (*); Giuliana Napolitano (*); Stefano Amente (*); Oliver Bensaude (*ENS Parigi, Francia*)

Background: Gli studi sviluppati dal nostro gruppo di ricerca si sono focalizzati in maniera specifica sul ruolo del complesso umano P-TEFb (CiclinaT1/CDK9) come necessario co-fattore cellulare di Tat, con particolare riguardo ai meccanismi molecolari che tale complesso svolge nella regolazione trascrizionale del LTR di HIV-1. Nell'ultimo anno abbiamo dimostrato che il complesso P-TEFb esiste *in vivo* in due forme con diverse attività catalitiche. Una forma attiva composta dall'eterodimero Ciclina T/CDK9, ed una forma inattiva composta da un complesso quaternario: Ciclina T/CDK9/7SK RNA/HEXIM1. È plausibile assumere che la comprensione accurata dei meccanismi molecolari di controllo dell'attività chinasi di P-TEFb sia strumentale per il disegno di un nuovo ed alternativo approccio sperimentale per un'efficiente inibizione di Tat e possibilmente della crescita virale.

Metodi: La unicità del sistema di regolazione di P-TEFb ha imposto una strategia di studio innovativa con l'utilizzo di diversi approcci sperimentali tra loro integrati. Abbiamo utilizzato metodiche di genetica molecolare come l'interazione in lievito (2 e 3-hybrid system), esperimenti di co-immunoprecipitazione, tecniche biochimiche per l'analisi dell'interazione tra Tat e P-TEFb *in vitro* ed *in vivo*. Tali studi ci hanno dato le basi per la costruzione e caratterizzazione di opportuni mutanti di HEXIM1 con funzione di dominanti-negativi di Tat.

Risultati: Abbiamo dimostrato che l'interazione tra HEXIM1 e il 7SK RNA è necessaria per l'inibizione *in vitro* ed *in vivo* di P-TEFb. In parallelo abbiamo dimostrato che la presenza dell'inibitore HEXIM1/7SK RNA inibisce il legame di Tat con P-TEFb. Abbiamo analizzato in dettaglio le basi molecolari che sottintendono la regolazione negativa di P-TEFb da parte di HEXIM1::7SK RNA e da tali studi abbiamo suggerito un modello di evoluzione molecolare del sistema lentivirale Tat::TAR RNA in grado di sovvertire il sistema cellulare P-TEFb::HEXIM1::7SK RNA. I nostri studi sulla struttura/funzione del complesso P-TEFb ci hanno permesso di individuare ed analizzare dei mutanti di HEXIM1 con funzione di dominanti-negativi per l'azione di Tat attraverso saggi *in vitro* ed *in vivo*.

Conclusioni: La recente identificazione di un partner inibitore dell'attività chinasi di CDK9 pone chiaramente le basi per uno studio sugli aspetti regolativi di P-TEFb in grado di fornire strumenti molecolari per una modificazione controllata di P-TEFb tale da indurre un'inibizione di Tat. Come riportato in un nostro recente lavoro abbiamo speculato che il sistema lentivirale Tat::TAR RNA si sia evoluto per sovvertire il sistema cellulare 7SK RNA/HEXIM1 in modo da eliminare il feed-back negativo dell'attività di CDK9 la quale è strettamente richiesta per l'espressione genica virale. È evidente che la possibilità di modulare l'attività di CDK9 attraverso un disegno sperimentale per una modificazione controllata del inibitore HEXIM1/7SK snRNP rappresenta una valida strategia per l'inibizione di Tat.

Contributo: 40F.44

IMMUNITÀ MUCOSALE E SISTEMICA SPECIFICA PER LA PROTEINA CCR5 NELLA RESISTENZA ALL'INFEZIONE DA HIV-1

Lucia Lopalco* (*Ospedale San Raffaele, Milano*); Claudia Pastori (*); Samuele Burastero (*); Greta Taskaris (*); Chiara Alberti (*); Claudia Barassi (*); Caterina Uberti Foppa (*); Guido Poli (*); Adriano Lazzarin (*)

Background: Negli ultimi anni sono emerse evidenze nelle quali la perdita di CCR5 sulla membrana cellulare ha portato ad una totale resistenza all'infezione da ceppi R5. Nello studio di popolazioni esposte al virus HIV-1, ma non infette (ESN) e di popolazioni che pur essendo sieropositive, sembrano parzialmente controllare il processo infettivo, definite Long Term Non Progressors (LTNP), sono state descritte due diverse condizioni predisponenti al fenotipo CCR5 negativo: i) un difetto genetico omozigote nel gene del CCR5 (definito Delta 32); e ii) la presenza di anticorpi anti CCR5 che riconoscono una ristretta regione conformazionale del CCR5 corrispondente al II dominio extracellulare, non coinvolta nel legame con le glicoproteine di HIV.

Metodi: Abbiamo analizzato campioni serici e mucosali di ESN tra cui: 128 soggetti italiani, 50 Cambogiani, 50 Vietnamiti e 50 Centrafricani (studio effettuato in collaborazione con G. Pancino, Pasteur Institute, Parigi). Abbiamo inoltre analizzato campioni provenienti da 87 soggetti LTNP Italiani e da 20 soggetti LTNP provenienti dagli Stati Uniti (studio in collaborazione con H. Burger e B. Weiser, State Department of Health, Albany, USA). Come controlli abbiamo analizzato 207 soggetti sani non esposti ad HIV, 70 pazienti AIDS e 135 pazienti con infezione stabilizzata e sotto regime terapeutico. Tutti i campioni sono stati analizzati per presenza di anticorpi anti CCR5.

Risultati: Gli anticorpi anti CCR5 sono stati identificati non soltanto in coorti caucasiche ma anche in coorti asiatiche di ESN e sia in partner sessuali di soggetti HIV sieropositivi sia in tossico dipendenti. Ciò dimostra quindi che gli anti CCR5 possono essere considerati dei marker di esposizione ad HIV in popolazioni con differente background genetico. (Lopalco *et al.*, *J Gen Vir* 2005). Abbiamo inoltre seguito per un periodo di circa 4 anni i soggetti LTNP positivi per anti CCR5, ed abbiamo rilevato che alcuni soggetti perdono questa risposta immunologica in corrispondenza di progressione di malattia, passando da uno stadio A1 (secondo la classificazione CDC) ad A2-A3 ed in qualche caso a C3 (acquisendo quindi uno stato di AIDS conclamato), nonostante l'assunzione di terapia antiretrovirale. I soggetti che invece mantengono gli anti CCR5 non modificano il loro quadro clinico, mantenendo uno stadio A1. Questi risultati evidenziano l'importanza degli anti CCR5 anche come marker di non progressione di malattia (Pastori *et al.* Submitted). In entrambe le popolazioni studiate (ESN e LTNP) gli anticorpi diretti contro il CCR5 bloccano la replicazione di HIV inducendo una stabile downregolazione del recettore. Il meccanismo d'azione di questi anticorpi è peculiare, in quanto essi inducono l'internalizzazione del recettore con cinetiche molto lente (sono necessarie 48 ore per ottenere una completa downregolazione). La ricomparsa del recettore sulla membrana richiede tempi molto lunghi, fino a più di una settimana. Inoltre, abbiamo identificato e caratterizzato anticorpi anti CCR5, presenti sia a livello sistemico, sia mucosale (saliva, lavaggio vaginale, liquido seminale di alcuni ESN) (Barassi *et al.*, *BLOOD*, 2004). Le IgA mucosali anti CCR5 bloccano la trascrizione di HIV in modelli sperimentali che prevedono l'utilizzo di cellule epiteliali ed intestinali.

Conclusioni: I risultati ottenuti rendono questo studio particolarmente rilevante non soltanto per una migliore comprensione dei meccanismi di resistenza ad HIV, ma per lo sviluppo di prodotti da utilizzare da utilizzare nella pratica clinica.

Contributo: 40F.45

INDUZIONE DI IGA MURINE ANTI CCR5 COME NUOVA STRATEGIA VACCINALE PER L'HIV

Lucia Lopalco* (*Ospedale San Raffaele, Milano*); Antonio Siccardi (*Universita degli Studi di Milano - Ospedale San Raffaele*); Claudia Pastori (*); Elisa Soprana (*); Emanuele Buratti (*International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste*)

Background: La proteina cellulare CCR5 è uno dei principali corecettori del virus HIV-1 e rappresenta il recettore più utilizzato da tutti i ceppi virali. Numerosi fattori contribuiscono a favorire la replicazione dei virus attraverso il CCR5, tra cui l'elevata quantità di CCR5 nelle mucose e la secrezione costitutiva di SDF1 (ligando naturale del CXCR4, altro corecettore per il virus HIV-1) sia a livello mucosale sia linfoide tissutale. L'infezione primaria da HIV è associata a virus dipendenti dal CCR5, ed i ceppi virali trasmissibili utilizzano generalmente il CCR5. Nel continente africano inoltre, le condizioni ambientali ed immunologiche determinano una maggiore espressione di CCR5 e quindi favoriscono la replicazione di virus CCR5 dipendenti (R5). Tutti questi fattori rendono necessaria l'elaborazione di nuove strategie terapeutiche e vaccinali per l'AIDS, basate sul blocco dei virus, dipendenti proprio dal CCR5. Due possibili scenari potrebbero essere attuati: i) elaborare nuovi antivirali che blocchino direttamente virus R5, ii) rendere il CCR5 non riconoscibile dal virus, agendo quindi direttamente sulla proteina cellulare. Negli ultimi anni sono emerse evidenze nelle quali la perdita di CCR5 sulla membrana cellulare ha portato ad una totale resistenza all'infezione da ceppi R5. Nello studio di popolazioni esposte al virus HIV-1, ma non infette (ESN) e di popolazioni che pur essendo sieropositive, sembrano parzialmente controllare il processo infettivo, definite Long Term Non Progressors (LTNP), abbiamo identificato anticorpi anti CCR5, in grado di bloccare l'infezione di ceppi di HIV dipendenti proprio da CCR5 (Pastori *et al.* Submitted).

Metodi: Al fine di indurre e riprodurre queste particolari risposte immunologiche umorali, abbiamo immunizzato topi balb/c con la regione del CCR5 riconosciuta dagli anticorpi umani. Come sistema immunogenico abbiamo usato una proteina precursore del capsido di un virus denominato Flock House Virus (FHV).

Risultati: Abbiamo ottenuto sia IgA che IgG che sembrano avere le stesse caratteristiche biologiche di quelle umane. In particolare abbiamo ottenuto e purificato IgA mucosali murine specifiche per il CCR5 che downregolano sia il CCR5 presente sulla superficie di cellule umane e di topo, inibiscono la chemotassi dipendente dal CCR5, e bloccano la replicazione di ceppi di HIV, che usano il CCR5 come corecettore. (Barassi *et al.* J Virol. 2005). È importante sottolineare che a livello di mucosa genitale, questi anticorpi inducono l'internalizzazione del CCR5 che rimane stabile per molti giorni e gradualmente ritorna ai valori normali dopo 4 settimane dall'ultima immunizzazione.

Conclusioni: Abbiamo identificato un sistema molecolare particolarmente adatto a presentare epitopi conformati e a stimolare il sistema immunitario in modo adeguato ed efficiente a produrre anticorpi neutralizzanti l'infezione da HIV. Inoltre, il meccanismo d'azione degli anticorpi prodotti è particolarmente interessante, in quanto la cinetica di downregolazione e riespressione del CCR5 presenta caratteristiche tali da rendere questo studio particolarmente rilevante per lo sviluppo di vaccini e di composti da utilizzare per uso topico.

Contributo: 40F.46

CHEMOKINES AND CHEMOKINE ANALOGUES WITH HIV-SUPPRESSIVE ACTIVITY

Lia Vassena* (*DIBIT, Milano*); Francesca Sironi (*); Renato Longhi (*CNR*); Vincenzo Pavone (*II Università di Napoli*); Paolo Lusso (*)

Background: The elucidation of the structural determinants of the anti-HIV activity of chemokines is essential for the rational design of novel effective HIV-entry inhibitors.

Methods: To develop effective CCR5-targeted HIV inhibitors, we have synthesized and tested a series of novel RANTES-derived short peptides, derived from the prototype peptide RANTES 11-29 (originally described in Nardese *et al.* Nat. Struct. Biol. 2001). Such peptide, which corresponds to the N-loop and part of the beta 1-strand regions of the natural chemokine, encompasses two hydrophobic clusters of 6 and 3 residues at the N- and C- terminus, respectively, linked by a hydrophilic linker.

Results: Analysis of more than 25 novel peptides, designed on the basis of the available NMR structure of RANTES, has permitted to demonstrate that:

- a) the hydrophilic linker region can be reduced by 1-3 aa. residues without compromising the biological activity;
- b) substitution of a single residue within the N-terminal hydrophobic patch induces an overall rigidification of the peptide structure resulting in a significant increase (about 1 log) in antiviral potency;
- c) additional aa. substitutions, rationally designed for inducing specific structural changes, further increase the specific activity against HIV, as assessed using both fusion assays and cell-free infection assays.

Conclusions: We have designed RANTES-derived synthetic peptides that exhibit anti-HIV activity well within the nanomolar range. Such peptides could therefore be considered for *in vivo* testing as potential HIV inhibitors.

Grant: 40F.47

LA PROTEINA VIF DEL VIRUS HIV-1 È UN FATTORE ACCESSORIO PER LA TRASCRIPTASI INVERSA E FACILITA IL SUPERAMENTO DEL BLOCCO DELLA SINTESI DEL DNA PROVIRALE CAUSATO DAI SITI ABASICI

Reynel Cancio* (*IGM-CNR*); Silvio Spadari (*); Giovanni Maga (*)

Background: La proteina Vif del virus HIV-1 svolge un ruolo essenziale nel modulare l'infettività del virus nei confronti dei linfociti CD4+ e dei macrofagi. L'assenza di Vif nelle cellule che producono il virus fa sì che i virioni rilasciati da tali cellule non siano in grado di completare un nuovo ciclo infettivo, arrestandosi alle fasi precoci della sintesi del genoma provirale. È stato dimostrato che Vif, nelle cellule che producono il virus, impedisce l'incorporazione nei virioni della deaminasi cellulare CEM15, la quale altrimenti agirebbe sull'RNA virale e/o sul DNA provirale neosintetizzato compromettendone la funzionalità. Tuttavia, questi risultati non spiegano il significato funzionale della frazione di Vif che viene incorporata nei virioni e si associa all'RNA genomico. Numerose evidenze sperimentali indirette sembrano indicare un possibile ruolo di Vif nel processo di retroscrittura virale. Sulla scorta di queste osservazioni, ci siamo proposti di:

- 1) Caratterizzare l'effetto di Vif sull'attività della RT di HIV-1, con particolare riferimento alla natura del substrato (RNA/DNA o DNA/DNA), alla fedeltà di sintesi, alla capacità della RT di superare lesioni sul DNA (siti abasici).
- 2) Individuare i determinanti strutturali di Vif e della RT essenziali per la loro interazione funzionale.
- 3) Caratterizzare le proprietà biochimico-fisiche di Vif, con particolare riferimento alla sua capacità di multimerizzare e di legare gli acidi nucleici, in relazione al suo ruolo funzionale nella retroscrittura virale.

Metodi: La RT di HIV-1 e la proteina Vif (sia wild type che mutanti di delezione) sono state espresse in forma ricombinante in *E.coli* e purificate per cromatografia di affinità. L'analisi cinetica e termodinamica è stata effettuata tramite saggi enzimatici *in vitro*. Sono stati impiegati substrati sintetici omo- ed eteropolimerici sia in forma DNA/DNA che RNA/DNA. I prodotti della reazione sono stati separati e visualizzati tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide denaturante.

Risultati: La nostra analisi ha evidenziato che Vif è in grado di: i) aumentare la processività di sintesi della trascrittasi inversa (RT) di HIV-1 e ii) aumentare la stabilità dell'interazione tra RT e acido nucleico. Questo attraverso un effetto specifico sulla velocità di associazione dell'enzima al primer, grazie ad un sensibile abbassamento dell'energia di attivazione occorrente per la formazione del complesso RT-DNA. Questa funzione richiede la presenza del dominio C-terminale di Vif, essenziale anche per la sua multimerizzazione, ma può prescindere dal dominio N-terminale, essenziale per la interazione di Vif con l'RNA genomico virale. Inoltre, Vif aumenta di 5 volte l'efficienza con cui la RT di HIV-1 supera il blocco imposto dalla presenza di un sito abasico sull'elica stampo.

Conclusioni: I nostri risultati consentono di ipotizzare che Vif abbia un duplice ruolo: contrastare l'azione della citidina deaminasi CEM15 e assistere la RT di HIV-1 in una sintesi più efficiente, consentendo inoltre di superare eventuali siti abasici (innescati dalla deaminazione delle citosine) sull'elica stampo. Dato che la RT effettua il superamento del sito abasicoincorporando aspecificamente una adenina, Vif aumenta anche la variabilità genetica del virus HIV, inducendo principalmente sostituzioni G->A. Il fatto che la multimerizzazione di Vif, ma non la sua interazione con l'acido nucleico, sia essenziale per queste funzioni, suggerisce un'interazione diretta proteina-proteina tra Vif e la RT.

Contributo: 40F.48

ENDOTELIO E HIV: IDENTIFICAZIONE DI NUOVI BERSAGLI MOLECOLARI

Massimo Mariotti* (*Università degli Studi di Milano*); Jeanette Maier (*)

Background: Disfunzioni endoteliali sono state descritte nei pazienti sieropositivi. Anche se è stato dimostrato che HIV lega la superficie endoteliale, tale disfunzione può essere ascrivibile a una risposta a citochine/ fattori di crescita secreti dalle cellule mononucleari infettate o a proteine virali, tra cui gp120 e Tat. Anche il regime terapeutico HAART, gravato da importanti complicazioni cardiovascolari, potrebbe avere un effetto tossico diretto sull'endotelio. Il nostro progetto si articola su due punti fondamentali: i) studio della modulazione dell'espressione genica da parte di Tat e citochine in cellule endoteliali; e ii) valutazione degli effetti diretti sull'endotelio dei farmaci utilizzati per la HAART. Mentre il secondo punto è ancora in fase di sviluppo, risultati sono stati ottenuti relativamente al primo.

Metodi: Sono utilizzate cellule endoteliali umane micro e macrovascolari. L'analisi differenziale è stata condotta mediante RNA fingerprinting. I reagenti - anticorpi policlonali, costrutti antisense, etc - sono stati ottenuti nel nostro laboratorio.

Risultati: Mediante analisi differenziale, abbiamo isolato nuovi fattori modulati da Tat e citochine. La conoscenza dei geni differenzialmente espressi può fornire informazioni utili a descrivere lo sviluppo e il differenziamento in tessuti normali e patologici, e può consentire l'identificazione di marcatori molecolari di potenziale utilità diagnostica e terapeutica. In quest'ottica, particolarmente promettenti ci sembrano gli studi condotti su EDF-1. I livelli di EDF-1 si riducono in risposta a Tat e nel corso del differenziamento endoteliale. Abbiamo dimostrato che EDF-1 è down regolato nelle cellule fuse di sarcoma di Kaposi sia umane sia murine derivate da topi Tat-transgenici, a indicare che queste cellule, la cui natura non è ancora del tutto chiarita, sono cellule altamente differenziate. EDF-1 sembra svolgere una duplice funzione, citosolica e nucleare. Nel citoplasma lega e sequestra la calmodulina, prevenendone l'azione attivante su molti enzimi, tra cui la ossido nitrico sintetasi (eNOS). Abbiamo, infatti, dimostrato che in cellule endoteliali che non esprimono EDF-1, in cui la calmodulina è libera, aumenta marcatamente la sintesi di ossido nitrico pur in assenza di modulazione dei livelli della proteina. Nel nucleo EDF-1 non interagisce direttamente con il DNA, ma lega vari attivatori trascrizionali tra cui la TATA Binding Protein e PPARgamma. Un altro fattore la cui espressione è modulata da Tat è una nuova tirosin fosfatasi, HD-PTP. Le PTP regolano con le tirosine chinasi la fosforilazione reversibile dei residui di tirosina e controllano, in questo modo, crescita e differenziamento cellulare, metabolismo e trascrizione. HD-PTP è un enzima citosolico, che possiede al C-terminale una sequenza PEST e all'N-terminale un dominio BRO. Altamente conservata nella scala evolutiva, HD-PTP è indotta da Tat a livello trascrizionale, mentre FGF-2 ne induce la degradazione via proteasoma. Dato il ruolo fondamentale della fosforilazione in tirosina nel modulare la risposta a Tat e altre citochine, HD-PTP potrebbe rappresentare un nuovo modulatore della loro funzione.

Conclusioni: EDF-1: i) la correlazione tra EDF-1 ed eNOS è rilevante visto che soggetti con AIDS hanno alti livelli di ossido nitrico, che regola la replicazione di HIV; ii) anche l'interazione PPARgamma-EDF-1 sembra interessante, visto che PPARgamma ha un ruolo anche nella regolazione della replicazione di HIV. HD-PTP: dato che Tat e FGF-2 ne modulano l'espressione, questa protein tirosin fosfatasi potrebbe essere un nuovo trasduttore del segnale implicato nella regolazione della funzionalità endoteliale.

Contributo: 40F.49

HIV SPECIFIC CD4 TH CELLS IN THE NAIVE REPERTOIRE

Giuseppe Li Pira* (*Istituto G. Gaslini, Genova*); Laura Bottone** (*Dip. di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi dell'Insubria, Varese*); Federico Ivaldi (*CBA, Genova*); Raffaele De Palma (*Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale, II Università di Napoli*); Fabrizio Manca (*)

Background: Virus specific T helper cells contribute to protective responses with different modes. They provide help for antibody production and for CTL expansion, that are important effector mechanisms. In the case of HIV infection, paradoxically, CD4 Th cells are the chief target of the virus and this may subvert the immune response. The role for Th cells has been recently reiterated and a preferential infection of HIV specific T cells by HIV has been documented. For these reasons we have developed HIV specific CD4 T cells lines that are currently being characterized for functional features.

Methods: CD4 T cell lines have been produced from seronegative subjects by repeated antigen stimulation with gp120 and with RT pulsed antigen presenting cells. Stimulation cycles, followed by IL2 expansion, are repeated every three weeks. Most of the studies were performed on a T cell line specific for one immunodominant gp120 peptide. Intracytoplasmic cytokine staining was applied to detect antigen induced production of IFN γ and TNF α . T cell lines were produced from the same subject at different time intervals over a period of fourteen years (1989, 1996, 2004). T cells were analyzed for clonal composition by spectratyping of the TCR BV gene families. A clone specific primer was obtained by sequencing the CDR3 region. The TCR VA gene usage was also analyzed by spectratyping and sequencing. ELISPOT assays were performed on naive and memory T cells selected with magnetic beads (Miltenyi protocol).

Results: The subject we have analyzed remained HIV seronegative and did not have a sexual behaviour at risk for HIV infection. Therefore, to the best of our knowledge, he did not encounter viral antigens. CD4 T cell lines were produced from his lymphocytes with a 14 year interval. The lines were derived from naive T cells, based on selection experiments that separated naive from memory T cell. The lines maintained the same fine specificity and an oligoclonal profile, with dominant usage of the TCR BV22 - AV38 gene families. These families were homogeneous according to spectratyping, showing single peaks. The BV22 CDR3 sequence obtained from the 1989 line tested positive also with the lines generated later on, suggesting long term persistence of the same clonotype. Clonal identity was formally confirmed by sequencing the AV38 gene family in the 1989 and in the 2004 T cells.

Conclusions: These results suggest that an HIV specific CD4 T cell clone, belonging to the non immune, naive repertoire, can persist for years *in vivo* in the absence of documented antigenic stimulation. This may be due cross reactivity (unlikely), to homeostatic proliferation that balances cell loss or to de novo generation of an identical clone exiting the adult thymus (unlikely). It will be interesting to know whether this is an anecdotal observation or whether it is a more general phenomenon. By using other T cell lines specific for retroviral antigens we have produced in the past from persistently seronegative subjects, we should be able to answer this question, that has important implications for the development of prophylactic vaccines to be administered to seronegative subjects.

Grant: 40F.50

REGULATION OF CHEMOKINE PRODUCTION AND RECEPTOR EXPRESSION IN HIV INFECTION

Antonio Sica* (*Istituto Farmacologico "M. Negri", Milano*); Tiziana Schioppa (*); Barbara Bottazzi (*); Annunciata Vecchi (*); Raffaella Bonocchi** (*Università degli Studi di Milano*); Massimo Locati (**); Alberto Mantovani (*Istituto Farmacologico "M. Negri" - Università degli Studi di Milano*)

The general objective of this investigation will be to pursue previous studies on the regulation of the chemokine system in relation to HIV infection. It was found that hypoxia differentially regulates HIV coreceptors, with selective upregulation of CXCR4. The molecular basis of this phenomenon was defined by promoter analysis and CHIP. In addition we have now discovered a second negative pathway of negative regulation represented by the promiscuous decoy receptor D6. Gene targeted mice show that D6 acts as a decoy and scavenger for CC chemokines which block the CCR5 port of entry. D6 is expressed on Kaposi's sarcoma and its relevance is being investigated.

Grant: 40F.51

LA PROTEINA NEF DI HIV-1 INDUCE LA CHEMIOTASSI DEI BASOFILI UMANI

Gianni Marone (*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*)

Background: Abbiamo precedentemente dimostrato che alcune proteine di HIV-1, gp120, Tat e gp41, possono attivare le cellule umane FceRI+ (basofili e mastociti) attraverso distinti meccanismi recettoriali. La gp120 è un superantigene virale di tipo immunoglobulinico che interagisce con la regione VH3 delle IgE inducendo il rilascio di istamina e di citochine (IL-4 ed IL-13). Tat interagisce con il recettore CCR3 presente sulle cellule FceRI+, attiva la chemiotassi dei basofili e dei mastociti umani, induce la sintesi ed il rilascio di IL-4 e di IL-13 ed aumenta l'espressione del recettore CCR3. Infine, gp41, attraverso l'interazione con recettori per FMLP (FPRL1 e FPRL2), induce la chemiotassi delle cellule FceRI+. Al fine di investigare ulteriori interazioni tra HIV-1 e cellule FceRI+ abbiamo studiato gli effetti di Nef. Nel nostro programma di ricerche intendiamo caratterizzare gli effetti di Nef sulle cellule FceRI+ con particolare riferimento alla sintesi e rilascio di istamina e di citochine (IL-4 ed IL-13); alla chemiotassi ed alla modulazione dei recettori chemochinici, ritenuti importanti per la penetrazione del virus (CXCR4, CCR5, CCR3).

Metodi: I basofili isolati dal sangue periferico di donatori sani sono purificati (>95%) usando un gradiente di Ficoll ed una selezione negativa mediante un cocktail di anticorpi coniugati con MACS MicroBeads. La chemiotassi dei basofili è eseguita utilizzando una camera di Boyden. Il dosaggio dell'istamina rilasciata dai basofili è effettuato con metodica fluoronefelometrica.

Risultati: Abbiamo dapprima dimostrato che concentrazioni scalari di due preparazioni ricombinanti di Nef (NL4-3 e ELI) (1-300ng/ml) inducono la chemiotassi dei basofili, in maniera dose-dipendente. Il massimo effetto chemiotattico, espresso come media del numero di basofili migrati rispetto al controllo, indotto da NL4-3 (56,5±5,2) ed ELI (62,5±5,8) si osserva alla concentrazione di 100 ng/ml. Al fine di verificare se l'attività chemiotattica di rNef fosse mediata dal recettore CXCR4, abbiamo condotto degli esperimenti di antagonismo con un anticorpo monoclonale anti-CXCR4. I basofili erano preincubati per 1h a 37°C con anti-CXCR4 (5µg/ml) ed indotti a migrare verso SDF (100ng/ml), Nef ELI (100ng/ml) e FMLP (500nM). La preincubazione con anti-CXCR4 è in grado di inibire la chemiotassi indotta da SDF (83,4±5,2%) e da Nef ELI (77,4±4,1%), al contrario non modifica la risposta indotta da FMLP. La relazione tra Nef e SDF è stata ulteriormente investigata valutando gli effetti di esperimenti di cross-desensibilizzazione sulla chemiotassi dei basofili. Le cellule erano preincubate con SDF (100ng/ml) o con Nef ELI (100ng/ml). Al termine dell'incubazione, i basofili erano indotti a migrare verso SDF, Nef ELI e FMLP. La preincubazione con SDF causa desensibilizzazione omologa (84,5±6,2%) ed eterologa con rNef (82,2±7,9%). Analogamente la preincubazione con Nef ELI è in grado di indurre sia desensibilizzazione omologa (86,8±8,4%), sia eterologa (81,3±7,5%), in ogni caso, non si modifica la risposta all'FMLP. In una serie successiva di esperimenti abbiamo valutato gli effetti di concentrazioni scalari di Nef ELI (1-300ng/ml) sul rilascio di istamina dai basofili umani. I risultati indicano che rNef, diversamente da gp120, non induce rilascio di istamina.

Conclusioni: I nostri risultati identificano un ulteriore meccanismo di interazione tra HIV-1 e cellule FceRI+ umane. La dimostrazione che Nef interagisce con il recettore CXCR4 presente sulle cellule FceRI+, consente di rafforzare l'ipotesi che queste cellule, reclutate nei siti di replicazione virale, possano svolgere un ruolo patogenetico nella progressione della malattia.

Contributo: 40F.52

UNA PERSISTENTE APOPTOSI DELLE CELLULE STAMINALI POTREBBE IMPEDIRE L'IMMUNORICOSTITUZIONE NEI PAZIENTI HIV+ IMMUNOLOGICAL NON RESPONDERS

Antonella Isgrò* (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Claudia Gramiccioni (*); Wilma Leti (*); Marcello Pinti** (*Università degli Studi di Modena*); Andrea Cossarizza (**); Fernando Aiuti (*); Ivano Mezzaroma (*)

Background: Nei pazienti con infezione da HIV-1 si osservano frequentemente anomalie ematologiche. L'aumentata produzione di citochine infiammatorie da parte delle cellule del microambiente midollare in corso di malattia da HIV-1 è in grado di inibire i processi ematolinfopoietici con l'esaltata espressione di Fas, con conseguente incremento di apoptosi delle cellule staminali. Scopo del nostro lavoro è stata la ricerca dei meccanismi midollari e apoptotici coinvolti nella mancata immunoricostituzione di pazienti "HIV+ immunological non responders".

Metodi: Abbiamo esaminato mediante RT-PCR i livelli trascrizionali del Fas, sia solubile che di membrana (Fas), e del Fas ligando (FasL) sulle cellule CD34+ di 9 pazienti HIV+ non responders. I valori misurati sono stati normalizzati ad un gene housekeeping di controllo (High basic protein, HBP). Le cellule sono state isolate dal test CFC, allestito per la valutazione del potenziale clonogenico midollare. L'analisi dei precursori staminali più immaturi è stata effettuata con test LTC-IC. È stata infine esaminata la produzione stromale di IL-7 con saggio ELISA. Al momento dello studio tutti i pazienti erano in trattamento con antiretrovirali includenti un inibitore delle proteasi (Indinavir o Nelfinavir) da almeno sei mesi; i valori dei linfociti T CD4+ erano in media $200 + 59$ cell/mm³, senza modificazioni significative in corso di terapia, a fronte di livelli non misurabili della viremia plasmatica (HIV-RNA < 50 copie/ml). I risultati sono stati confrontati con quelli in precedenza ottenuti in 10 pazienti "responders" al trattamento HAART.

Risultati: In confronto al gruppo responders è stato osservato nei pazienti non responders un recupero parziale del potenziale clonogenico midollare dopo HAART, e una significativa ridotta riserva di cellule staminali primitive al test LTC-IC ($5.6 + 4.8$ col/106 BMMCs vs $15 + 5$ col/106 BMMCs nei responders). Un tentativo di compenso era rappresentato da livelli più alti di produzione stromale di IL-7 ($0.4 + 0.04$ pg/mL vs $0.1 + 0.1$ pg/mL nei responders), a fronte di una significativa up-regolazione dell'espressione di Fas nelle cellule CD34+ dei pazienti HIV+ non responders ($20 + 21.8$ copie/1000 HBP vs $6.6 + 5.6$ copie/1000 HBP; $p = 0.04$), ed alti livelli di FasL ($15.2 + 4.7$ copie/1000 HBP vs $3.7 + 4.1$ copie/1000 HBP). Al contrario, nei pazienti HIV+ responder è stata osservata una diminuzione dei livelli di espressione di Fas rispetto i valori pre-trattamento (da $29.5 + 31.7$ copie/1000 HBP a $6.6 + 5.6$ copie/1000 HBP), in parallelo alla normalizzazione dei parametri immuno-virologici, al miglioramento dell'attività clonogenica midollare ed alla diminuzione della produzione midollare di TNF- α ; (da $23.9 + 3.5$ pg/ml a $14.4 + 5.5$).

Conclusioni: Nei pazienti HIV+ non responders sono stati osservati alti livelli di Fas e FasL, espressione di un'esaltata apoptosi delle cellule staminali, in parallelo con un'alterata crescita *in vitro* delle colonie midollari e una ridotta riserva di cellule staminali primitive. La mancata riduzione dell'espressione di Fas e FasL nei pazienti "immunological non responders" in parallelo ad una scarsa riserva midollare potrebbero spiegare i livelli persistentemente bassi dei linfociti T CD4+ in questi pazienti, a conferma che una persistente apoptosi delle cellule staminali possa impedire una normale immunoricostituzione.

Contributo: 40F.53

PATOGENESI DEI LINFOMI AD EFFUSIONE PRIMARIA

Sara Baccarini* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Gaia Sciaranghella (*); Annunziata Gloghini (*CRO, Aviano*); Laura Malavasi (*); Gabriele Moracci (*); Davide Carlei (*); Patrizia Leone (*); Daniela Compagnoni (*); Roberto Marinelli (*); Mario Falchi (*); Cecilia Sgadari (*); Antonino Carbone (*); Ensoli Barbara (*); Paolo Monini (*)

Background: I linfomi ad effusione primaria (PEL) sono assai infrequenti nella popolazione generale, ma insorgono con accresciuta incidenza nei soggetti infettati da HIV. I PEL originano in seguito alla localizzazione di cellule B infettate da HHV8 nelle cavità corporee, ove proliferano rilasciando VEGF. Lo sviluppo dell'effusione avviene in assenza di una massa tumorale preesistente, tuttavia tumori secondari con localizzazione extracavitaria contraddistinguono i PEL all'autopsia. Durante la crescita in cavità, le cellule linfomatose formano due popolazioni, una libera nella fase liquida, l'altra adesa alla superficie della membrana sierosa. Tuttavia, non è chiaro se la popolazione aderente origini in seguito all'homing delle cellule linfomatose alle sierose e sia richiesta per il rilascio di cellule proliferanti in cavità, o medi la comparsa delle localizzazioni extracavitare e la progressione del PEL.

Metodi: Topi SCID sono stati inoculati intraperitonealmente con un 3, 5 o 10 milioni di cellule PEL (BCBL-1), osservati per lo sviluppo di effusioni, e sacrificati a tempi progressivi per determinare le modificazioni reattive della membrana peritoneale, la comparsa di cellule adese e di tumori solidi. I fluidi delle cavità peritoneale di topi non inoculati o delle effusioni sono stati analizzati per VEGF e bFGF, ed impiegati in saggi di proliferazione delle cellule PEL per determinare il ruolo di fattori dell'ospite nell'insorgenza dell'effusione.

Risultati: Lo sviluppo di PEL ha richiesto l'inoculo di un numero elevato di cellule, e, nei topi inoculati con 3 e 5 milioni di cellule, si è dimostrato infrequente. L'adesione delle cellule PEL alla membrana sierosa è avvenuta in tempi successivi allo sviluppo dell'effusione, in associazione alla comparsa di alterazioni reattive della membrana. Queste includevano attivazione e perdita dell'integrità del mesotelio, attivazione di cellule stromali, infiltrazione del tessuto sub-mesoteliale da parte di cellule mieloidi, produzione di bFGF da parte di queste cellule, e neoangiogenesi. Il bFGF è stato identificato alla superficie del mesotelio e legato alla matrice extracellulare, e in forma solubile nella cavità. Esperimenti di proliferazione hanno indicato che il fluido della cavità peritoneale è in grado di promuovere la sopravvivenza e la crescita delle cellule PEL. Le cellule PEL non legano efficientemente le molecole della matrice extracellulare, ma aderiscono al bFGF, assai probabilmente a causa della elevata espressione di superficie di syndecan-1. Il bFGF solubile induce la polarizzazione delle cellule PEL, e si localizza nell'uropodo, ove viene rilocalizzato il syndecan-1. Nel tempo, le cellule adese rivestono l'intera membrana sierosa, con comparsa di tumori solidi associati alla membrana peritoneale e a localizzazione extracavitaria.

Conclusioni: Lo sviluppo dei PEL richiede l'azione paracrina di fattori presenti nelle cavità, che promuovono la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule linfomatose. La crescita dell'effusione induce processi reattivi della sierosa, assai probabilmente indotti dal VEGF rilasciato dalle cellule PEL, che attiva le cellule mesoteliali e richiama granulociti e macrofagi. Questi processi inducono il rilascio di bFGF, che induce angiogenesi e promuove l'adesione e la polarizzazione delle cellule PEL, l'invasione della membrana sierosa, e la formazione di tumori solidi secondari all'effusione. Perciò, il VEGF, il bFGF e molecole di adesione rappresentano possibili bersagli per la terapia dei PEL.

Contributo: 40F/L

HIV INFLUENZA DIFFERENTEMENTE I PROCESSI DI MEGACARIOCITOPOIESI, MIELOPOIESI ED ERITROPOIESI

Andrea Costantini* (*Azienda Ospedaliero Universitaria, Ospedali Riuniti di Ancona*); Simona Giuliodoro** (*Università Politecnica delle Marche*); Stefania Mancini (**); Luca Butini (*); Christina Maria Regnery (*); Guido Silvestri (*Emory University, Atlanta, GA, USA*); Francesco Greco (**); Pietro Leoni (**); Maria Montroni (**)

Background: Nel corso dell'infezione da HIV è descritto il riscontro di anomalie ematologiche nella cui patogenesi gioca un ruolo significativo l'instaurarsi di difetti HIV-indotti nei processi di sviluppo dei vari lineages ematologici. Resta ancora da chiarire: 1) la precocità di insorgenza di tali difetti, se cioè questi compaiono prima delle alterazioni ematologiche periferiche; 2) l'impatto di HIV sulla crescita delle diverse colonie, CFU-GM, BFU-E e CFU-MK; 3) se le anomalie interessino contemporaneamente tutti i tipi di colonie o solo alcune di esse.

Metodi: Sono stati sottoposti a prelievo di sangue periferico 52 individui HIV-positivi (28 naive e 24 ART) e 28 soggetti HIV-negativi senza alcuna evidenza di malattie di interesse internistico (gruppo di controllo). Campioni di midollo osseo sono stati inoltre ottenuti da 9 pazienti HIV-positivi (4 naive e 5 ART) e da 16 soggetti HIV-negativi (donatori di midollo o persone sottoposte a intervento di protesi d'anca). Aliquote di 5000 progenitori CD34+, purificati mediante separazione immunomagnetica, sono state poste in coltura in terreni idonei a favorire la crescita delle diverse colonie. Dopo 11-14 giorni è stata effettuata al microscopio la conta delle colonie ottenute. L'analisi dell'espressione, sulle cellule CD34+, dei recettori per le citochine SCF, GM-CSF, EPO, TPO, IL-3 ed IL-6, presenti nei medium di coltura, è stata condotta in citometria a flusso.

Risultati: I valori medi di emoglobina, leucociti e piastrine sono risultati nei limiti di norma in tutti i gruppi in studio. Utilizzando cellule CD34+ provenienti da sangue periferico si è osservata una ridotta crescita di CFU-MK nei soggetti HIV-positivi naive rispetto a quelli sottoposti ad ART e ai controlli (19.1 ± 15.2 vs 42.3 ± 25.1 vs 47.7 ± 39.2 – $p=0.006$ naive/controlli e $p=0.8$ ART/controlli). Diversamente, lo sviluppo di CFU-GM è risultato superiore nei soggetti HIV-positivi naive rispetto ai trattati ed ai controlli (45 ± 33 vs 32.8 ± 21.4 vs 27.1 ± 19.1 – $p=0.029$ naive/controlli e $p=0.7$ ART/controlli). La crescita di BFU-E è apparsa invece aumentata rispetto ai controlli sia nei soggetti HIV positivi naive che in quelli sottoposti ad ART (naive= 235 ± 97 ; ART= 263.6 ± 153.2 ; controlli= 178.4 ± 102.8 – $p=0.19$ naive/controlli e $p=0.03$ ART/controlli). I dati ottenuti da cellule CD34+ purificate da midollo osseo hanno mostrato un andamento simile. Una significativa correlazione inversa è stata osservata fra i livelli plasmatici dell'HIV-viremia e lo sviluppo di CFU-MK, mentre non si è riscontrata alcuna correlazione fra viremia e crescita di CFU-GM e BFU-E. L'analisi dell'espressione dei recettori per le diverse citochine utilizzate in coltura non ha evidenziato differenze tra i gruppi.

Conclusioni: Nei soggetti HIV-positivi naive la crescita delle CFU-MK *in vitro* appare ridotta pur in presenza di normali conte piastriniche, a suggerire un difetto precoce nella megacariocitopoiesi che la ART appare in grado di prevenire e/o correggere. La bassa crescita delle colonie megacariocitarie non sembra legata ad un deficit dei recettori per le citochine, mentre si correla con livelli elevati di HIV-viremia, il che conferma il ruolo svolto dal virus nella patogenesi di questo fenomeno. Un comportamento di segno opposto si osserva nello sviluppo delle CFU-GM così come nella crescita delle BFU-E: il primo appare infatti elevato nei soggetti HIV positivi naive rispetto agli altri gruppi, la seconda risulta aumentata sia negli individui naive che in quelli sottoposti ad ART, a prospettare che i processi di mielo- ed eritropoiesi subiscano in corso di HIV alterazioni riconducibili a meccanismi differenti rispetto alla megacariocitopoiesi.

Contributo: 40F.54

NK CELL ACTIVATION ASSOCIATED WITH DECREASED CYTOLYTIC FUNCTION IN PERIPHERAL BLOOD OF HIV-1 INFECTED PATIENTS

Andrea De Maria* (*Università degli Studi di Genova*); Manuela Fogli (*) ; Paola Costa** (*Istituto G. Gaslini, Genova*); Giuseppe Murdaca (*) ; Maurizio Setti (*) ; Stefania Mazza (*) ; Alessandro Moretta (*) ; Antonio Piccioletto (*) ; M. Cristina Mingari (*) ; Lorenzo Moretta (**)

Background: Upon infection with HIV-1, a vigorous immune response is mounted, leading to the production of virus-specific or neutralizing antibodies, and to HIV-1-specific T cell responses. One of the hallmarks of these adaptive immune responses occurring during HIV-1 infection is represented by the finding of massive T-cell activation in peripheral blood lymphocytes of infected patients that parallels the progressively decreased HIV-1-specific CD8+CTL immune responses, and is strongly associated with clinical progression to AIDS and death in untreated patients. Thus, we tried to determine whether in addition to T cells also NK cells become consistently activated during the course of HIV-1 infection and may be involved in the impairment of the cytolytic function of NK cells that has been associated to a decreased expression of the natural cytotoxicity receptors (NCR) on NK cells.

Methods: We analyzed a group of 25 viraemic untreated HIV-1-infected patients, compared to a control group of 22 uninfected donors. Freshly drawn purified peripheral NK cells were obtained by density gradient and commercial bead-and mAb-based purification systems. Surface antigen phenotype was evaluated by two- or three-color cytofluorometry using appropriate mAbs. Cytotoxicity assays were performed by ⁵¹Cr release assay against tumor cell targets either in the presence or absence of specific mAbs.

Results: Purified peripheral NK cells displayed significant levels of activation (15-35%) with an incomplete pattern (HLA-DR+CD69+CD25-NKp44-). Activated (HLA-DR+CD69+) peripheral NK cells expressed a NCR^{low} phenotype by cytofluorometric analysis in all the patients, and did not derive from a homogeneous/oligoclonal expansion *in vivo* as analyzed by expression of HLA-specific inhibitory NK cell receptors. As determined by cytotoxicity assays, activated NK cells show a decreased cytolytic function in HIV-1 infected patients. Additional analyses to determine possible correlations with disease surrogate markers revealed that, NK cell activation is correlated to plasma viraemia in this group of patients and that the level of reduced expression of NKp46 is inversely correlated with the degree of cell activation. We further analyzed a group of HCV-infected patients to verify whether mechanisms leading to reduced expression of NCRs and NK cell activation. In this group of patients none of these perturbations of NK cell function could be observed.

Conclusions: The decrease in NK cell function that is observed during HIV-1 infection is associated not only with decreased NCR expression, but also with significant and incomplete NK cell activation *in vivo*. Incomplete peripheral NK cell activation appears to be restricted to chronic HIV-1 infection and is not associated in general to persistent virus replication. These results suggest a consistent continuous involvement of the innate immune response in the failure to control viral replication in HIV-1 infection, and possible virus-specific or replication-specific involvement in its origin.

Grant: 40F.55

ELEVATA PREVALENZA ED ETEROGENEITÀ DEI SOTTOTIPI NON B: CREAZIONE DI UN DATABASE NAZIONALE E CARATTERIZZAZIONE FILOGENETICA

Claudia Balotta* (*Istituto di Malattie Infettive e Tropicali, Università degli Studi di Milano*); Chiara Riva (*); Cristina Mussini (*Clinica delle Malattie Infettive e Tropicali, Università degli Studi di Modena*); Maurizio Zazzi (*Dip. di Biologia Molecolare, Università degli Studi di Siena*); Mauro Moroni (*)

Background: La marcata variabilità genetica di HIV-1 ha, ad oggi, generato 28 forme genetiche circolanti: 9 sottotipi (A-D, F-H, J e K), 5 sotto-sottotipi (A1, A2, A3, F1 e F2), 16 Circulating Recombinant Forms, (CRF) e un numero elevato di Unique Recombinant Forms (URF). A seguito delle ondate migratorie di individui provenienti dall’Africa, dall’Est Europa e dal Centro e Sud America, si è verificato l’ingresso di ceppi non B di HIV-1 in Italia. La sorveglianza di queste dinamiche epidemiche associata alla caratterizzazione molecolare, in particolare in relazione alla terapia antiretrovirale, sono diventati di cruciale importanza.

Metodi: Per allestire il database nazionale dei dati epidemiologici, immunologici, virologici e terapeutici, e delle sequenze del gene pol di pazienti con sottotipo non B, abbiamo valutato le sequenze di 3932 pazienti di cui 415 afferenti alla coorte I.Co.N.A, 321 appartenenti agli studi SPREAD e CASCADE e 3196 pazienti che erano stati sottoposti a un saggio genotipico per la resistenza ai farmaci antiretrovirali da parte dell’HIV Monitoring Service dell’Università di Siena (MSUniSI). Le regioni proteasi e RT di HIV-1 sono state sequenziate mediante il saggio ViroSeq v.2 (Abbott Diagnostics) o una procedura standardizzata home made. L’analisi filogenetica e di ricombinazione sono state effettuate utilizzando 85 sequenze di riferimento mediante i software Phylip e Simplot v2.5.

Risultati: La prevalenza globale dei sottotipi non B era 8.5 % (n=335) variando dal 5.6%, 8.3% e 8.4% degli studi retrospettivi I.Co.N.A, MSUniSI e CASCADE al 17.8% rilevato nello studio prospettico SPREAD. L’analisi del trend temporale della prevalenza delle infezioni non B in 176 pazienti a data di sierconversione nota, afferenti al MSUniSI, ha rivelato che essa era il 3.2% nel’84, è rimasta inferiore al 10% fino al’97, arrivando a rappresentare il 54% delle nuove infezioni nello’03 (C2 for trend p<00001). La caratterizzazione filogenetica ha evidenziato che solo il 54.3% dei ceppi non B erano sottotipi puri (46.7% F1, 17% C, 13.8% A1, 11% G, 3.8% A3, 3.8% D, 1.7% A2, 1.7% J e 0.5% F2). Tra le CRF (39.1%), le forme genetiche erano: CRF02_AG (74%), CRF01_AE (13.7%), CRF06_cpx (4.6%), CRF12_BF (4.6%), CRF09_cpx (1.5%), CRF011_cpx (0.8%) e CRF13_cpx (0.8%). Le URF erano il 6.6% e mostravano pattern complessi di ricombinazione. Tre sequenze di soggetti non africani non correlati si raggruppavano con il ceppo MAL, isolato nel 1985 in Africa, mentre 3 URF, identificate in pazienti africani non correlati, mostravano un mosaicismo simile a quello descritto in un soggetto europeo. Tre URF ottenute da pazienti africani la ricombinazione coinvolgeva un sottotipo e una CRF.

Conclusioni: In accordo con le ondate migratorie, un numero crescente di nuove infezioni sono oggi sostenute in Italia da ceppi non B puri, CRF e URF. Tutti i sottotipi puri, con l’eccezione dei ceppi H e K, sono stati identificati in queste casistiche, inclusi i ceppi A3, descritti recentemente e ceppi ricombinanti di ricombinanti. Le elevate prevalenze di CRF e URF suggeriscono che la complessità genetica di HIV-1 aumenterà all’aumentare dei ceppi cocircolanti. Due forme genetiche uniche, identificate in questo studio, sono candidate, attraverso la caratterizzazione del loro intero genoma, a essere classificate come nuove CRF.

Contributo: 40F.56

LA PROTEINA TAT DI HIV-1 AUMENTA L'INFETTIVITÀ VIRALE MEDIANTE UN MECCANISMO INDIPENDENTE DALLA CAPACITÀ TRANSATTIVANTE: UNA NUOVA INVASINA RETROVIRALE

Filomena Nappi* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Valentina Bordignon (*); Alessandra Borsetti (*); Giovanni Barillari (*); Antonella Caputo (*Università degli Studi di Padova*); Antonella Tinari (*); Fabiana Superti (*); Valeria Fiorelli (*); Mudit Tyagi** (*International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste*); Mauro Giacca (**); Aurelio Cafaro (*); Paolo Monini (*); Barbara Ensoli (*)

Background: Il Tat dell'HIV-1 è una proteina regolatrice prodotta a tempi precoci dall'infezione ed essenziale per l'espressione e per la replicazione dell'HIV-1. L'alta espressione di Tat nell'infezione acuta, si associa con il rilascio della proteina nell'ambiente extracellulare in assenza di morte cellulare o di alterazioni della permeabilità di membrana. Di conseguenza, il Tat extracellulare viene rilevato nel siero e nei tessuti di pazienti HIV infetti dove si trova prevalentemente legato alle cellule ed ai vasi. Dopo il rilascio, una piccola parte della proteina rimane in forma solubile mentre l'altra si lega ai proteoglicani eparansolfati della matrice cellulare. La forma solubile entra nelle cellule, si localizza nel nucleo dove attiva l'espressione genica e la replicazione dell'HIV-1 in cellule infette. Molto poco è invece conosciuto sul ruolo svolto dal Tat legato all'ECM nell'infezione da HIV.

Metodi: Tramite un sistema di infezione su piastre ricoperte da molecole di adesione utilizzando un HIV a singolo ciclo di replicazione e contenente il gene CAT come reporter, abbiamo studiato le interazioni tra il Tat immobilizzato e le particelle di HIV-1. Piastre non trattate sono state incubate con Tat, bloccate con BSA ed incubate con supernatanti virali. Il virus non legato alle piastre è stato rimosso tramite lavaggi e vi sono state aggiunte le cellule. I livelli di infezione sono stati misurati tramite attività CAT nei lisati cellulari oppure il virus attaccato sul pozzetto è stato quantificato tramite saggio ELISA. Abbiamo inoltre utilizzato tecniche di immuno microscopia elettronica per evidenziare l'immobilizzazione delle particelle virali su particelle di lattice ricoperte di Tat.

Risultati: Abbiamo dimostrato che Tat extracellulare lega le particelle virali ed aumenta l'efficienza di infezione in maniera dose-dipendente consentendo l'infezione di cellule CD4⁺ con input virali che normalmente non sono in grado di generare infezione. Il legame di HIV a Tat non coinvolge l'interazione dell'Env ma l'interazione Env-CD4 è comunque necessaria per l'entrata del virus nelle cellule. La capacità transattivante di Tat non è richiesta per l'infezione di HIV assistita da Tat adeso poiché delezioni o mutazioni della proteina che ne annullano la capacità transattivante sono in grado di promuovere l'infezione virale. Sia la regione basica che quella ricca in cisteina di Tat sono necessarie per il legame delle particelle virali alla proteina adesa.

Conclusioni: Il Tat extracellulare aumenta l'infezione da HIV-1 mediante un meccanismo indipendente dalla transattivazione che richiede il legame delle particelle virali alla proteina. I nostri dati suggeriscono che Tat si comporta da invasina, proteine di origine microbiologica in grado di aumentare l'infettività e la diffusione dei patogeni. Questi dati forniscono informazioni per lo sviluppo di nuove strategie per la lotta contro l'AIDS.

Contributo: 40F/M

INTERAZIONE TRA PROTEINE CELLULARI E VIRALI: RUOLO NELLA PATOGENESI E NELLO SVILUPPO DI STRATEGIE TERAPEUTICHE

Arianna Calistri* (*Università degli Studi di Padova*); Arianna Loregian (*); Cristiano Salata (*); Cristina Parolin (*); Giorgio Palù (*)

Background: Lo studio dei determinanti cellulari e virali in grado di influenzare il ciclo replicativo di HIV-1 risulta di fondamentale importanza nell'identificazione dei corretti target di terapia. Partendo da tale presupposto, la nostra ricerca è rivolta al chiarimento di meccanismi biologici coinvolti nella suscettibilità e resistenza cellulare all'infezione da parte di HIV-1.

Metodi: L'approccio sperimentale si è avvalso di tecniche di virologia classica e molecolare e di proteomica, al fine di caratterizzare interazioni fra proteine cellulari e virali implicate nella regolazione del ciclo replicativo di HIV-1.

Risultati: Il progetto si è articolato in diverse linee di ricerca, focalizzate su specifiche fasi del ciclo replicativo virale. Per quanto riguarda le fasi iniziali, abbiamo dimostrato come HSV-1 e HHV-8, due importanti agenti opportunistici in corso di AIDS, siano in grado di alterare lo spettro di cellule infettabili da HIV-1. In particolare abbiamo evidenziato: i) la capacità di HSV-1 di pseudotipizzare HIV-1 in cellule coinfezionate, rendendolo così in grado di infettare cellule CD4 negative (Calistri *et al.*, 2003); ii) la capacità di specifiche proteine di HHV-8 di influenzare l'ingresso di HIV-1 in cellule monocito-macrofagiche, grazie alla modulazione dell'espressione del corecettore CCR5 (Salata *et al.*, submitted). Inoltre, al fine di identificare fattori importanti per l'infettività, abbiamo preso in considerazione la proteina virale Nef, individuando una serie di partner cellulari, tra cui Dinamina 2, essenziale nel processo di endocitosi mediato da clatrina (Pizzato *et al.*, submitted). L'interazione tra Nef e Dinamina2 è in corso di studio. Per quanto riguarda le fasi post-entry, ci siamo concentrati sulla caratterizzazione molecolare dell'interazione Tat-Sp1. I risultati indicano che i) non vi è interazione diretta tra Tat e Sp1; ii) specifiche proteine cellulari (TBP; TAF 55; ciclina T; CDK9) non mediano tale interazione (Loregian *et al.*, 2003). Inoltre, al fine di identificare fattori cellulari coinvolti nella risposta cellulare all'infezione da HIV-1, abbiamo valutato il coinvolgimento della proteina ShcA, un mediatore di apoptosi indotta da stress. I nostri dati dimostrano che l'inibizione di ShcA aumenta l'efficienza di replicazione di HIV-1 nei linfociti T, indicandone un possibile ruolo nella patogenesi dell'AIDS (Benetti *et al.*, 2004). Per quanto riguarda le fasi finali del ciclo replicativo, basandoci su dati raccolti dal nostro gruppo di ricerca che dimostrano come ubiquitina e MVB svolgano un ruolo fondamentale nella gemmazione virale (Strack *et al.*, 2002; Strack *et al.* 2003), stiamo valutando se e a quale livello proteine cellulari appartenenti ai due pathway intervengano nella regolazione del ciclo vitale di HIV-1. A tale proposito, abbiamo caratterizzato il ruolo di specifiche ubiquitina ligasi nella gemmazione dei retrovirus, e abbiamo identificato una serie di proteine cellulari in grado di interagire specificamente con HIV-1, e delle quali stiamo caratterizzando il ruolo negli stadi finali della replicazione virale.

Conclusioni: I dati ottenuti ci hanno consentito di identificare una serie di meccanismi molecolari e di interazioni proteiche che risultano importanti in diverse fasi del ciclo replicativo di HIV-1. La loro caratterizzazione permetterà di chiarire ulteriormente la patogenesi dell'AIDS e rappresenterà un primo passo verso la messa a punto di strategie terapeutiche innovative.

Contributo: 40F.57

MALATTIA LINFOPROLIFERATIVA GERMINOTROPICA UNA NUOVA PATOLOGIA KSHV-CORRELATA DEL PAZIENTE HIV-POSITIVO

Carlo Parravicini* (*Anatomia Patologica, Ospedale L. Sacco, Milano*); Cristina Rossi (*Malattie Infettive, Ospedale Ca' Foncello, Treviso*); Licia Laurino (*Anatomia Patologica, Ospedale Ca' Foncello, Treviso*); Erika Longhi** (*Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi di Milano, Ospedale L. Sacco, Milano*); Pietro Zerbi (*); Annalisa Ridolfo (**); Mario Corbellino (**)

Background: Il Virus Erpetico del Sarcoma di Kaposi (KSHV) è coinvolto nella patogenesi di due distinte malattie linfoproliferative, la Malattia di Castleman Multicentrica (MCD) e il Linfoma Plasmablastico delle Sierose (PEL). Entrambe le malattie sono di più frequente riscontro nei pazienti HIV-positivi, dove possono associarsi al Sarcoma di Kaposi (KS). Nei soggetti con KS classico è stata inoltre descritta una terza malattia linfoproliferativa, definita come “germinotropic lymphoproliferative disorder” (GLD) o malattia linfoproliferativa germinotropica, secondaria ad una generalizzata coinfezione KSHV/EBV delle cellule B del centro germinativo. Casi di GLD non sono stati finora osservati in pazienti con infezione da HIV e non è noto se la GLD sia una patologia KSHV-correlata o se la coinfezione con EBV sia necessaria per lo sviluppo della malattia.

Metodi: Lo studio riporta le caratteristiche cliniche, istopatologiche e virologiche del primo caso di GLD osservato in un paziente HIV-positivo.

Risultati: Il paziente (maschio, 41aa, omosessuale, 49 CD4, HIV RNA nel plasma >100.000 copie/ml) presentava pancitopenia, splenomegalia (16cm), hairy leukoplakia linguale e lesioni di KS alla cute della coscia ed al glande. La clinica era caratterizzata dall'improvvisa comparsa di linfadenopatia ascellare accompagnata da sintomi B e da una viremia per KSHV superiore a 300.000 copie per µg di DNA estratto da sangue periferico. Il trattamento con HAART (DMP + D4T + 3TC) non modificava il quadro clinico e si procedeva a biopsia linfonodale. Il linfonodo presentava caratteristiche morfologiche, immunohistochimiche e molecolari (centri germinativi costituiti da plasmablasti positivi per KSHV-Orf73, vIL6 e T1.1RNA con restrizione fenotipica lambda delle catene leggere in assenza di riarrangiamento monoclonale delle Ig) diagnostiche per GLD. A differenza dei casi sinora descritti, tuttavia, gli elementi plasmablastici erano negativi per EBV dopo ibridazione in situ per EBER e PCR in fase liquida su DNA linfonodale. Veniva istituito un trattamento con VP16 (100mg/m²) cui si associava scomparsa della sintomatologia e una progressiva discesa dei livelli ematici di KSHV sino a negativizzazione nell'arco di due settimane. A distanza di oltre nove mesi dalla diagnosi il paziente, tuttora in trattamento antitumorale, è in completa remissione clinica e virologica.

Conclusioni: I nostri risultati dimostrano che, a differenza di quanto in precedenza osservato nei soggetti senza infezione da HIV, lo sviluppo di GLD è unicamente legato all'infezione da KSHV e non richiede una coinfezione con EBV. La trasformazione plasmablastica dei centri germinativi della GLD presenta consistenti analogie con quanto si verifica nei PEL, un'altra patologia KSHV-correlata dove è frequente ma non obbligatoria la coinfezione KSHV/EBV. Nei soggetti HIV-positivi con KS una linfadenopatia localizzata accompagnata da sintomi sistemici può essere secondaria a GLD. La GLD risponde a trattamento antitumorale con etoposide. Biopsia linfonodale e quantificazione seriale della viremia sono essenziali per la diagnosi e il monitoraggio terapeutico.

Contributo: 40F.58

A HIGHLY ORDERED NETWORK OF HIV-1 RT MUTATIONS REGULATES THE CONTINUOUS ESCAPE FROM ANTIVIRAL DRUGS

Carlo Federico Perno* (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Francesca Ceccherini Silberstein (*); Valentina Svicher (*); Tobias Sing (*Max Planck Institute for informatics Saarbrücken*); Maria Santoro (*); Caterina Gori** (*INMI L Spallanzani, Roma*); Federico Gago (*Univeristy of Alcalá, Spain*); Roberta D'Arrigo (**); Maria Concetta Bellocchi (**); Sara Giannella (*); Ada Bertoli (*); Antonella D'Arminio Monforte (*Università degli Studi di Milano*); Andrea Antinori (**)

Background: During its spread among humans, HIV-1 has developed an extraordinary degree of genetic diversity. The pol-gene, encoding for viral enzymes such as reverse transcriptase (RT) and protease, is subjected not only to natural variation, but also to selection pressure imposed by pharmacological treatment. Under these conditions, the virus is able to escape from antiviral drugs by accumulating mutations, either alone or in clusters. It is conceivable that more mutations (and association of mutations), than those currently known, are involved in the complex drug-resistance mechanism. For this reason, we characterized 15 RT mutations whose drug-resistance role is still unknown.

Methods: 1906 HIV-1 subtype B pol sequences from 551 drug-naïve patients and 1355 NRTI-treated patients were collected and analysed. The association of mutations with NRTI-treatment and viremia/CD4 was assessed by chi-square tests and median-tests, respectively. Covariation analysis was based on the binomial correlation coefficient (ϕ) and hierarchical clustering. Benjamini-Hochberg method was used to correct for multiple comparisons (False Discovery Rate=0.05).

Results: Twelve mutations (K20R, V35M, T39A, K43E/N/Q, K122E, G196E, E203D/K, H208Y, D218E) were positively associated with specific NRTI-treatment and virological failure, and showed strong correlations (in pairs and clusters) with specific NRTI-resistance mutations lying on divergent evolutionary pathways, thus suggesting a positive contribution to NRTI-resistance. Moreover, the failure in presence of K43E, K122E or H208Y mutation was significantly associated with higher viremia and lower CD4 cell count. In contrast, two mutations (I50V, R83K), with frequency significantly decreased in NRTI-treated patients with respect to drug-naïve patients, were rarely found in co-presence of NRTI-resistance mutations and were negatively correlated with such mutations, suggesting an inhibitory effect on the appearance of NRTI-resistance mutations, presumably by increasing the genetic barrier. Finally, one common polymorphism (F214L) was either positively associated with various different key drug-resistance mutations and pathways (D67N, K70R, K219Q, T215F), or negatively associated with others (M41L, L210W, T215Y, and R83K).

Conclusions: our study contributes to a better definition of RT mutational patterns that regulate both positively and/or negatively NRTI-resistance and strongly suggests that other mutations beyond those currently known to confer resistance should be considered to define more precise algorithms to correctly predict resistance to antiretroviral drugs.

Grant: 40F.59

STUDIO DEI MECCANISMI DI MORTE CELLULARE NEL NEURO-AIDS

Roberta Nardacci* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Andrea Antinori (*) ; Luigi Maria Larocca (*Anatomia Patologica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Alessandra Amendola (*) ; Jean Luc Perfettini** (*Gustave Roussy, Villejuif, France*); Guido Kroemer (**); Mauro Piacentini (*)

Background: L'infezione da parte del virus HIV induce, in molti casi, danni severi al sistema nervoso centrale. Il 20-40% dei pazienti affetti da AIDS (sindrome da immunodeficienza acquisita) sviluppano neuropatologie tra le quali l'encefalite da HIV e la HAD (HIV associated dementia complex). La neuropatologia associata con l'encefalite da HIV include l'attivazione della microglia, la diminuzione di sinapsi e la perdita di neuroni ed è inoltre spesso caratterizzata dalla formazione di cellule giganti multinucleate o sincizi che derivano dalla fusione di cellule non-neuronali. Recenti studi condotti nel nostro laboratorio hanno contribuito all'identificazione dei meccanismi molecolari alla base della morte cellulare indotta da HIV attraverso la formazione di sincizi. I sincizi si trovano in uno stadio pre-apoptotico, caratterizzato dall'espressione dell'enzima TG2, e sono destinati a morire in seguito all'attivazione di una cascata apoptotica controllata da p53 e mediata a livello mitocondriale da BAX.

Metodi: Nel nostro studio abbiamo analizzato sezioni autoptiche di cervello di 43 pazienti HIV-infetti 17 dei quali presentano encefalite correlata all'infezione di HIV. In dettaglio, le sezioni di corteccia frontale montate su vetrino sono state sparaffinate ed utilizzate per analisi istochimiche ed immunohistochemiche e di immunofluorescenza. Le sezioni sono state marcate con anticorpi primari per identificare varie proteine tra le quali: la chinasi p53 fosforilata in serina 46, la proteina chinasi mTOR/FRAP, la proteina I κ B, la proteina Puma, la proteina neurofilament 200kD per marcare i neuroni, la proteina glial fibrillary acidic protein (GFAP) per marcare le cellule gliali, l'enzima transglutaminasi "tissutale" (TG2). Abbiamo utilizzato poi la tecnica del TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) per marcare le cellule apoptotiche.

Risultati: I dati finora ottenuti hanno mostrato che il numero di sincizi, presenti nel cervello di circa il 35% dei pazienti con encefalite, correla con un elevato numero di cellule che esprimono la proteina p24 di HIV o mostrano apoptosi rilevabile con la tecnica TUNEL. Le analisi istochimiche ed immunohistochemiche hanno dimostrato che i sincizi sono destinati a morire seguendo un meccanismo di morte cellulare per apoptosi, precedentemente delineato per i sincizi generati dalla proteina Env di HIV-1 *in vitro*. Infatti abbiamo osservato l'over-espressione della proteina I κ B e della chinasi mTOR, la quale media l'attivazione del fattore di trascrizione pro-apoptotico p53 e la conseguente over-espressione di due potenziali effettori dell'apoptosi mitocondriale ossia le proteine Puma e transglutaminasi "tissutale" (TG2). L'attivazione di mTOR e l'induzione di Puma sono state osservate sia nei sincizi che nei neuroni morenti mentre la fosforilazione di I κ B e TG2 sono state rilevate solamente nei sincizi.

Conclusioni: I risultati ottenuti aggiungono nuove conoscenze circa i meccanismi di morte cellulare attivati da HIV nel sistema nervoso centrale umano e forniscono nuove basi per poter produrre dei farmaci mirati. Tale necessità è resa prioritaria anche dal fatto che le attuali terapie antiretrovirali come l'HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) non hanno eliminato la demenza generata da HIV ma riescono solamente a rallentare il processo di neurodegenerazione solo in alcuni tipi di neuropatia.

Contributo: 40F.60

LA VIA CD28/RELA/NF-KB ATTIVA LA LTR DI HIV NEI LINFOCITI T

Loretta Tuosto* (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Marzia Soligo (*); Roberta Cianfrocca (*); Enza Piccolella (*)

Background: NF-kB è uno dei principali regolatori della trascrizione genica di HIV ed agisce sia direttamente, legando specifici siti nell'enhancer della LTR, sia indirettamente regolando la trascrizione di citochine pro-infiammatorie. Poiché, queste citochine sono a loro volta potenti attivatori di HIV, l'analisi dei meccanismi attraverso i quali tali fattori sono regolati nei linfociti T infettati potrebbe essere d'aiuto nel controllo delle risposte immuni durante l'infezione da HIV. Il gruppo proponente ha recentemente dimostrato che la molecola costimolatoria CD28 e Vav-1 sono i principali regolatori dell'attivazione di NF-kB nei linfociti T ed intervengono nella trascrizione di citochine pro-infiammatorie (Marinari *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004). A tali evidenze si aggiunge la nostra recente dimostrazione che Nef, pur interferendo con il macchinario di segnalazione del TCR, non influenza l'attivazione di NF-kB. Partendo da tali risultati il progetto presentato dal proponente ha avuto lo scopo di chiarire i meccanismi attraverso i quali CD28 regola la trascrizione e replicazione del virus HIV, analizzando in particolare le subunità NF-kB coinvolte nella regolazione di tale trascrizione, ed il ruolo di Vav-1 e della proteina Nef.

Metodi: LINEE CELLULARI E TRASFEZIONE. Come sistema sperimentale è stata utilizzata la linea T Jurkat CD4+ CD28+ (J1G5) stabilmente trasfettata con il gene reporter della luciferasi sotto il controllo della LTR di HIV-1SF2 e fibroblasti murini esprimenti molecole B7.1 umane (Dap3/B7). La linea J1G5 è stata trasfettata con diversi vettori d'espressione mediante elettroporazione (260 V, 950 microF). Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule J1G5 sono state stimolate in presenza o assenza dei fibroblasti Dap3/B7 in piastre da 96 pozzetti, per ulteriori 8 ore. L'attività luciferasi è stata misurata utilizzando specifici kit (Promega).

IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA (ChIP). Dopo fissazione in 1% di formaldeide, le cellule J1G5 sono state lisate e la cromatina frammentata mediante sonicazione. I diversi fattori trascrizionali sono stati immunoprecipitati utilizzando anticorpi specifici e la presenza della LTR nel DNA estratto è stata valutata tramite PCR.

Risultati: 1) Per identificare le subunità NF-kB coinvolte nella regolazione della trascrizione di HIV, la linea J1G5 è stata trasfettata con i vettori d'espressione codificanti RelA, c-rel, RelB, p50 e p52. Dopo 24 ore dalla trasfezione è stata misurata l'attività luciferasi. I risultati ottenuti hanno dimostrato che RelA è l'unica subunità NF-kB in grado di attivare la LTR di HIV in linee cellulari T.

2) Nei linfociti T la stimolazione del CD28 induce l'attivazione, la traslocazione nucleare ed il legame di RelA a specifici promotori genici. Per verificare se il CD28 potesse attivare la LTR di HIV, le cellule J1G5 sono state stimolate per 8 ore con i fibroblasti Dap3/B7. I risultati ottenuti dimostrano che la stimolazione del CD28 induce un aumento significativo di circa 3-5 volte dell'attività LTR. Esperimenti di ChIP, hanno evidenziato che la subunità RelA NF-kB è reclutata sulla LTR in seguito alla stimolazione del CD28. Inoltre, l'espressione di Vav-1 ulteriormente potenzia l'attività LTR indotta dal CD28 (circa 10 volte).

Conclusioni: I nostri risultati, per quanto preliminari hanno messo in evidenza:

- 1) RelA/NF-kB è il principale regolatore della LTR di HIV nei linfociti T;
- 2) RelA è reclutato sulla LTR di HIV e la attiva in seguito alla stimolazione del CD28 e in assenza dell'antigene;
- 3) Vav-1 coopera con il CD28 nell'indurre l'attivazione della LTR di HIV.

Contributo: 40F.61

DOSAGGIO DELLA CICLINA B E DI ALTRE PROTEINE CICLO DIPENDENTI COME MARCATORI DI RISPOSTA ALLA TERAPIA ANTIRETROVIRALE

G. Piedimonte (*Istituto di Chimica Biologica, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"*)

Background: È ormai chiaro che la perdita dei linfociti CD4⁺ associata all'infezione da HIV è causata non solo dagli effetti citopatici del virus nelle cellule infette, ma anche dagli elevati livelli di apoptosi indotta da attivazione riscontrati nelle cellule non infette. Diversi lavori infatti mostrano come l'espressione di markers di attivazione nei linfociti T correli, meglio della viremia, con una rapida progressione della patologia. Abbiamo precedentemente dimostrato che l'eccessiva attivazione immunitaria induce nei linfociti T di pazienti infetti da HIV una profonda perturbazione caratterizzata da anormale attivazione del complesso ciclina B/p34 cdc2 e alterata struttura nucleolare con aumentati livelli di fosforilazione e degradazione della nucleolina. Questi dati sono di notevole interesse alla luce di evidenze recenti che mostrano, in linee cellulari *in vitro*, un'associazione tra il sorgere dell'apoptosi e la degradazione e traslocazione dal nucleo al citoplasma della nucleolina. Gli obiettivi di questa prima parte dello studio sono (1) analizzare i livelli di espressione, degradazione, e localizzazione della nucleolina nei linfociti di pazienti infetti da HIV e controlli; (2) identificare se l'anormale regolazione della nucleolina correla con un'aumentata attivazione e suscettibilità all'apoptosi delle cellule T.

Metodi: L'espressione intracellulare della nucleolina è stata quantificata tramite Western blot. La localizzazione citosolica e nucleare è stata studiata sia in microscopia confocale che in Western blot eseguito su estratti citosolici e nucleari. La localizzazione in membrana è stata analizzata in confocale e in citofluorimetria a 4 colori. La citofluorimetria è stata utilizzata anche per analizzare i livelli di attivazione, proliferazione e apoptosi nei linfociti CD4⁺ e CD8⁺. Sono stati utilizzati pazienti infetti da HIV non in terapia, con alta viremia (>10.000) e basso numero di CD4⁺ (<400).

Risultati: L'analisi in microscopia confocale dei linfociti ha mostrato una localizzazione della nucleolina notevolmente alterata tra i pazienti infetti da HIV e i controlli. Nella grande maggioranza (>90%) delle cellule T dei controlli la nucleolina è finemente dispersa all'interno del nucleo, come atteso per cellule resting. Nei pazienti infetti tale tipologia cellulare o non è mai rappresentata, oppure è presente solo in una piccolissima percentuale di cellule. Si identificano invece due tipologie cellulari, distribuite in maniera simile, completamente diverse rispetto ai controlli. Una popolazione caratterizzata da nuclei strutturalmente regolari ma completamente svuotati di nucleolina, che risulta esclusivamente extra-nucleare. Una seconda popolazione con nuclei irregolari, picnotici, tipici di cellule danneggiate, con nucleolina distribuita in modo irregolare sia nel citosol che nel nucleo. Entrambe queste tipologie suggeriscono che nell'infezione da HIV la grande maggioranza delle cellule del sangue periferico hanno attivato i processi di apoptosi. Questa evidenza è confermata dall'analisi in citofluorimetria che ha evidenziato, nei pazienti infetti, un significativo aumento nella percentuale di cellule T che esprimono la nucleolina nella superficie cellulare, un fenomeno associato con l'attivazione di endonucleasi che portano alla degradazione del DNA. Nel loro insieme i risultati indicano che (1) un'alta percentuale di linfociti T di pazienti infetti da HIV è destinata a morire per apoptosi e (2) la nucleolina può giocare un ruolo importante in un nuovo pathway apoptotico coinvolto nella deplezione di tali cellule nel progredire dell'AIDS.

Contributo: 40F.62

IMMUNITÀ NATURALE ALL'INFEZIONE DA HIV NEI PAZIENTI LTNP: RUOLO DEI LINFOCITI T GAMMA/DELTA E DEI FATTORI SOLUBILI AD AZIONE ANTIVIRALE

Fabrizio Poccia* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Carla Nisii (*); Chiara Agrati (*); Concetta Castilletti (*); Cristiana Gioia (*); Maria Rosaria Capobianchi (*); Marie Lise Gougeon (*Institut Pasteur, Paris*); Vincenzo Galati (*); Gianpiero D'Offizi (*)

Background: I linfociti T Vgamma9/Vdelta2 producono chemochine capaci di inibire i ceppi di HIV-1 che usano il corecettore CCR5 ed anche altri fattori solubili con attività antivirale non ancora identificati. Nonostante queste cellule possano svolgere una potente attività antivirale nei donatori sani, modificazioni della composizione e della funzionalità dei linfociti T gamma/delta sono state ripetutamente osservate nei pazienti con infezione da HIV. In particolare, la deplezione dei linfociti T Vgamma9-Jgamma1.2/Vdelta2 è attualmente l'unica evidenza di una perdita di cellule dipendente dal riarrangiamento del TCR che sia stata direttamente associata all'immunopatogenesi dell'infezione da HIV. Nell'ambito dell'azione concertata ELVIS finalizzata allo studio dei LTNP, lo scopo del nostro studio è di contribuire alla creazione di una coorte multicentrica di individui LTNP e di approfondire gli studi immunologici della risposta immune naturale, con particolare riferimento al ruolo dei linfociti T gamma/delta e dei fattori solubili ad azione anti-HIV.

Metodi: Lo studio si basa sullo sviluppo di un registro clinico-epidemiologico di pazienti afferenti all'INMI L. Spallanzani con malattia da HIV caratterizzati da lenta progressione della malattia (LTNP) e relativo banking biologico. Sui campioni del sangue periferico sono eseguite analisi molecolari per lo studio dell'espressione della regione Vgamma1.2 del TCR gamma/delta tramite una tecnica chiamata Immunoscope. La presenza e la quantificazione dei fattori solubili con attività antivirale prodotti dai linfociti T gamma/delta viene eseguita su linee cellulari *in vitro*. Successivamente viene effettuata una caratterizzazione proteomica dei fattori solubili con attività antivirale e/o immunomodulante prodotti dai linfociti T gamma/delta.

Risultati: È stata preparata una scheda informativa per il consenso alla partecipazione allo studio ed è iniziato l'arruolamento della coorte di pazienti LTNP. Sono state standardizzate le metodiche per l'analisi qualitativa, quantitativa e funzionale dei linfociti T Vgamma9/Vdelta2, con particolare riferimento al differenziamento in cellule effettrici di tipo citochinico e/o citotossico, tramite l'analisi del riarrangiamento Vgamma1.2 e lo studio dell'espressione dei seguenti marcatori: CD27, CD45RA, IFN-gamma, CD107. Inoltre, è stata sviluppata una metodica basata sull'impiego di linee cellulari per identificare, tra i fattori solubili prodotti dai linfociti T Vgamma9/Vdelta2, la presenza di molecole con attività antivirale *in vitro*. Infine, sono stati validati alcuni sistemi di analisi proteomica per l'identificazione dei fattori antivirali e/o immunomodulanti prodotti dai linfociti T Vgamma9/Vdelta2.

Conclusioni: L'analisi qualitativa, quantitativa e funzionale dei linfociti T Vgamma9/Vdelta2 nei pazienti LTNP rappresenta un approccio mirato all'identificazione di nuovi fattori prognostici e alla comprensione dei meccanismi di immunità naturale all'infezione da HIV. A tale proposito, la caratterizzazione biochimica e funzionale dei fattori antivirali prodotti dai linfociti T gamma/delta ha come potenziale ricaduta l'identificazione di nuovi composti e bersagli terapeutici.

Contributo: 40F.63

ATTIVAZIONE DI STAT-1 E “PRIMING” VIRALE INDOTTI DA HIV-1 E DEFINIZIONE DI UN NUOVO MODELLO DI LATENZA VIRALE IN LINFOCITI T CD4+ “RESTING” RILASCIATI DA TESSUTI LINFOIDI INFETTATI *EX VIVO*

Guido Poli* (*IRCCS S. Raffaele, Milano*); Chiara Bovolenta (*Mol. Med. SpA*); Silvia Ghezzi (*); Andrea Crotti (*); Matteo Trimarchi (*); Jean Charles Grivel** (*NIH*); Leonid Margolis (**); Massimo Alfano (*)

Background: La capacità di HIV d'integrarsi stabilmente nel genoma delle cellule infettate rappresenta l'ostacolo fondamentale all'eradicazione dell'infezione e l'elemento principale di fallimento dei protocolli di sospensione programmata della terapia antiretrovirale. Abbiamo quindi studiato l'interazione di HIV-1, sia R5 che X4, con linfociti T CD4+ “resting” da sangue periferico e l'infezione di istocolture linfoidei, e caratterizzato una popolazione linfofocitaria analoga spontaneamente rilasciata in coltura.

Metodi: I linfociti T CD4+ sono stati isolati da PBMC di donatori sieronegativi mediante selezione negativa ed incubati con diversi ceppi di HIV-1, sia R5 che X4, sia immediatamente (t0) che dopo 5-7 gg (t2) di coltura in assenza di mitogeni o IL-2. L'attivazione e la caratterizzazione di STAT sono state effettuate mediante EMSA e analisi di supershift mediata da Ab specifici per diverse STAT. La replicazione di HIV è stata monitorata mediante saggio di attività RT. Tessuti linfoidei ottenuti da diversi organi linfoidei (soprattutto tonsille) sono stati suddivisi in blocchetti da 2 mm³ ed infettati con diversi virus R5 ed X4 in assenza di stimoli mitogenici. Il fenotipo dei linfociti è stato definito da marcatori di superficie nonché dall'espressione dell'Ag nucleare Ki67. La presenza di cellule infettate è stata dimostrata mediante PCR quantitativa per HIV DNA (TaqMan).

Risultati: L'incubazione di linfociti T “resting” (CD25, CD69, HLA-DR, Ki67 negativi) con HIV-1, sia R5 che X4, non risultava per se nella replicazione virale, misurata come attività RT. Inoltre, l'analisi della via JAK-STAT non rivelava un'attivazione immediata o precoce (per esempio mediata dall'interazione di gp120 con CD4 e recettore chemochinico). Tuttavia, si osservava una lenta attivazione di STAT dopo ca. 48-72 h, con un picco a 5-7 gg. L'analisi mediante supershift ha permesso d'identificare in STAT1 la proteina attivata dall'incubazione con HIV. Quindi le cellule sono state incubate con una molteplicità d'infezione (MOI) di 0,2 al t0, o di 0,1 al t0 ed il rimanente 0,1 al t2. Solo nella seconda modalità è stata osservata una potente replicazione virale. Abbiamo confermato l'infezione produttiva di tessuti linfoidei in assenza di stimoli esogeni sia da parte di virus X4 che R5. Abbiamo inoltre osservato che una popolazione di linfociti viene rilasciata spontaneamente in coltura dai tessuti (sia infettati che non). Questa popolazione è costituita sia da linfociti B che T (CD4>CD8) con le caratteristiche “resting” sopradefinite. Nel caso di tessuti infettati non era osservata alcuna produzione virale da parte di questa popolazione cellulare anche se mantenuta in coltura per 30 gg. Tuttavia l'analisi del DNA virale ha dimostrato che una frazione di cellule era sicuramente infettata ed infatti la stimolazione di questa popolazione con PHA o IL-2 risultava in un'espansione logaritmica sia dei livelli di DNA virale che di attività RT.

Conclusioni: I linfociti T resting “sentono” l'esposizione ad HIV come rivelato dall'attivazione lenta della via JAK-STAT e dall'innesco di una produttiva replicazione virale quando riesposti entro alcuni giorni al virus stesso. Una popolazione di linfociti T CD4+ resting viene rilasciata dai tessuti linfoidei infettati *in vitro* con caratteristiche di latenza virale ed inducibilità da mitogeni ed IL-2.

Contributo: 40F.64

MECCANISMI D'INIBIZIONE TRASCRIZIONALE DI HIV-1 AD OPERA DI IKAPPAB-ALFA

Antimina Puca* (*Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II"*); Giuseppe Fiume (*) ; Camillo Palmieri** (*Dip. di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Catanzaro "Magna Grascia"*); Francesca Trimboli (**); Laura Luberto (**); Francesco Olimpico (*) ; Giuseppe Scala (*) ; Ileana Quinto (*)

Background: Il nostro gruppo di ricerca ha descritto la rilevanza biologica dei fattori trascrizionali NF-kappaB nell'espressione dei retrovirus HIV-1 e SIVmac239 (I. Quinto *et al.* 1993 *J. Biol. Chem.* 268: 26719-26724; M. R. Ruocco *et al.* 1996 *J. Biol. Chem.* 271: 22479-22486; M. Mallardo *et al.* 1996 *J. Biol. Chem.* 271: 20820-20827). Inoltre, abbiamo dimostrato l'utilità d'impiego di IkappaB-alfaS32/36A, un inibitore non proteolizzabile di NF-kappaB, per l'inibizione della crescita di HIV-1 e SIVmac239 in colture cellulari ed *in vivo* nella scimmia (I. Quinto *et al.* 1999 *J. Biol. Chem.* 274: 17567-17572; I. Quinto *et al.* 2004 *J. Biol. Chem.* 279: 1720-1728; C. Palmieri *et al.* 2004 *Retrovirology* 1: 45). Scopo del presente progetto è lo studio dei meccanismi molecolari d'inibizione di HIV-1 opera di IkappaB-alfa. Di fatto, gli LTR di HIV-1 sono attivati in maniera cooperativa dai fattori trascrizionali NF-kappaB ed Sp1, e l'assenza di NF-kappaB può essere vicariata da Sp1. Pertanto, abbiamo ipotizzato che IkappaB-alfa possa reprimere la trascrizione di HIV-1 con meccanismi alternativi alla sottrazione dei complessi NF-kappaB. Per testare questa ipotesi, abbiamo analizzato le interazioni fisiche e funzionali di IkappaB-alfa con il transattivatore virale Tat.

Metodi: L'attività inibitoria di IkappaB-alfa è stata analizzata mediante trasfezione in transient degli LTR di HIV-1 fusionati a geni reporter in presenza di vettori d'espressione di Tat ed IkappaB-alfa. L'associazione fisica di IkappaB-alfa con Tat è stata analizzata in esperimenti di co-immunoprecipitazione *in vivo*, GSTpull-down e microscopia confocale. I siti d'interazione fisica e funzionale delle proteine IkappaB-alfa e Tat sono stati mappati mediante l'impiego di mutanti di delezione o sostituzione di basi.

Risultati: In esperimenti d'espressione in transient, IkappaB-alfa inibisce di circa il 90% l'attivazione degli LTR virali mediata da Tat; le sei anchirine di IkappaB-alfa sono richieste per l'inibizione di Tat. In esperimenti di GST-pull down e co-immunoprecipitazione IkappaB-alfa si associa a Tat; la regione ricca in arginine di Tat è richiesta per il legame ad IkappaB-alfa. Quando singolarmente trasfettate, Tat ha localizzazione esclusivamente nucleare, mentre IkappaB-alfa è prevalentemente citoplasmatica. Quando co-trasfettate, Tat ed IkappaB-alfa colocalizzano preferenzialmente nel citoplasma.

Conclusioni: IkappaB-alfa associa il transattivatore virale Tat sequestrandolo nel citoplasma ed inibendone l'attività trascrizionale. La sequenza minima inibitoria di IkappaB-alfa può essere utile allo sviluppo di peptidi inibitori di Tat e della trascrizione di HIV-1.

Contributo: 40F.65

GLI INIBITORI DELLA PROTEASI DI HIV-1 ALTERANO IL CICLO VITALE DELLE CELLULE DENDRITICHE

Maria Letizia Giardino Torchia* (*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*); Anna Maria Masci **(*Università degli Studi di Napoli "Federico II", IRCS San Raffaele Pisana**); Laura Vitiello (**); Roberto Cauda (*Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Luigi Racioppi (*)

Background: Gli inibitori della proteasi di HIV-1 (PIs) progettati per inibire specificamente l'enzima aspartico-proteasi virale, sono in grado di esercitare effetti diversi sulle cellule del sistema immunitario. Nel nostro studio abbiamo analizzato la capacità di questa categoria di farmaci di interferire sul ciclo vitale di cellule dendritiche umane.

Metodi: Gli effetti di Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir ed Amprenavir sono stati valutati su cellule dendritiche generate da monociti CD14+ umani per selezione positiva da sangue periferico (MDC). Abbiamo analizzato: (i) apoptosi dei monociti; (ii) generazione di MDC immature; (iii) risposta ad endotossina batterica.

Risultati: Nel nostro studio osserviamo che i PIs sono in grado di indurre apoptosi nei monociti, riducendo quindi la resa di MDC immature. Le MDC immature mostrano marcate alterazioni del fenotipo, con ridotti livelli di espressione dei marcatori tipici del differenziamento. Le MDC generate in presenza di PIs (PI-MDC) mostrano difetti nella risposta indotta da endotossina batterica con riduzione del numero di cellule terminalmente differenziate, della produzione di citochine pro-infiammatorie e della loro capacità allostimolatoria.

Conclusioni: I nostri dati dimostrano che gli inibitori della proteasi di HIV-1 sono in grado di agire sul ciclo vitale di cellule dendritiche umane tramite meccanismi indipendenti da quelli antiretrovirali. Questa osservazione potrebbe essere utile per una migliore comprensione degli effetti indotti dai PIs in corso di infezione da HIV-1.

Contributo: 40F.66

EFFETTI DI TAT SULLA LIBERAZIONE E RICAPTAZIONE DI GLUTAMMATO IN NEURONI E MICROGLIA

Maurizio Raiteri* (*DIMES, Università degli Studi di Genova*); Luisa Minghetti** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Anna Pittaluga (*); Gian Carlo Bellenchi (**); Fabio Longordo (*); Roberta De Simone (**)

Background: L'infezione da HIV-1+ è spesso accompagnata dallo sviluppo di una neuro-patologia detta Demenza Associata ad AIDS, caratterizzata dalla perdita della coordinazione motoria, delle capacità di apprendimento, da neuropatia periferica, da alterazione della personalità e depressione. Le modificazioni comportamentali si osservano principalmente nella fase avanzata dell'infezione, quando sono evidenti danni neuronali, gliosi diffusa, diminuzione delle arborizzazioni neuronali, pallore mielinico. Il danno neuronale è di origine eccitotossica. Siccome il virus non infetta i neuroni, si è ipotizzato che queste alterazioni siano causate da proteine virali (gp120 e Tat) liberate dal virus o dalle cellule infettate. Inoltre, considerato l'intervallo temporale tra la comparsa di HIV-1 nel CNS e l'insorgenza del danno neuronale, è stato ipotizzato che nella prima fase vengano attivati dei meccanismi di difesa che contengono il danno neuronale. Il rationale della nostra ricerca è valutare se la proteina virale Tat liberata dalla microglia infetta possa modulare la funzionalità dei neuroni circostanti e/o delle cellule microgliali stesse ad es. modificando l'espressione e la funzione di sistemi specifici quali recettori e/o trasportatori per l'acido glutammico.

Metodi: L'effetto di Tat sulla liberazione di glutammato (misurato come liberazione di [3H]D-aspartato) e di [3H]noradrenalina è valutata utilizzando la tecnica della superfusione di sinaptosomi. L'effetto di Tat sulla ricaptazione di glutammato e di GABA è valutata in esperimenti di ricaptazione di [3H]D-aspartato e di [3H]GABA in sinaptosomi e in cellule microgliali in coltura. L'effetto di Tat sulla espressione dei trasportatori per il glutammato in colture primarie di microglia è valutata mediante western blot e RT-PCR.

Risultati: Tat (100pM-10nM) non modifica la liberazione spontanea di [3H]D-aspartico e di [3H]noradrenalina da sinaptosomi di ratto in superfusione. Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando sinaptosomi preparati da corteccia umana rimossa durante interventi neurochirurgici mirati alla rimozione di tumori profondi, ad indicare che la mancanza di effetto non è legata all'utilizzo di preparati murini. Sono in progresso esperimenti per valutare l'effetto della proteina sulla liberazione di glutamato e noradrenalina causata da recettori per il glutammato. Inoltre, è stata messa a punto la tecnica standardizzata per lo studio della ricaptazione di glutamato e di GABA da sinaptosomi di ratto. I dati ad oggi ottenuti sembrano indicare che Tat (100pM-3nM) non modifichi significativamente la ricaptazione di glutammato. Per lo studio dei sotto tipi di trasportatori per il glutammato GLAST e GTL-1 (omologhi delle isoforme umane EAAT-1 e EAAT-2) è stata messa a punto la metodica per l'analisi dell'espressione genica (RT-PCR) mentre sono ancora in corso esperimenti per la valutazione della specificità di diversi anticorpi commercialmente disponibili per lo studio a livello proteico. Dati preliminari indicano che la microglia esprime entrambi i sottotipi, seppure a livelli inferiori rispetto agli astrociti.

Conclusioni: I dati da noi ottenuti sono preliminari e non permettono ad oggi di definire se e come Tat sia in grado di modificare i meccanismi recettoriali e/o la funzione di trasportatori a livello neuronale e gliale. Tuttavia, la disponibilità di metodiche sperimentali specifiche, messe a punto in questa prima fase, consentirà di affrontare rapidamente gli obiettivi previsti dal progetto.

Contributo: 40F.67

RUOLO DI TAT NELL' APOPTOSI: REGOLAZIONE DELL' ESPRESSIONE DI CASPASI-10 E C-FLIP: UN POTENZIALE MECCANISMO DI INIBIZIONE DELLA MORTE CELLULARE TRAIL-MEDIATA

Davide Gibellini* (*Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Bologna*); Francesca Vitone (*); Pasqua Schiavone (*); Maria Carla Re (*)

Background: I nostri studi si sono focalizzati sul ruolo di Tat nella patogenesi delle lesioni indotte da HIV-1 a livello del compartimento ematopoietico e linfoide. Come è noto, Tat, oltre a favorire la replicazione virale, svolge un'azione autocrina/paracrina sulle cellule attraverso la regolazione di specifici geni e l'attivazione di vie di traduzione, influenzando in tal modo la proliferazione/sopravvivenza cellulare. Anche se esistono dati di letteratura contrastanti relativamente alla protezione dall'apoptosi Tat-mediata, i nostri risultati forniscono una serie di elementi utili a risolvere tale controversia, suggerendo che l'azione di Tat sulla sopravvivenza cellulare sia strettamente dipendente dalla concentrazione e dal modello cellulare studiato. Infatti, recentemente abbiamo dimostrato (*Clin. Exp. Immunol* 2003;131:428-35) che l'esposizione a Tat di progenitori ematopoietici è in grado di indurre un incremento dell'espressione di CXCR4 esclusivamente sulle cellule eritroidi, (suggerendo, per la prima volta, un coinvolgimento diretto di Tat nella patogenesi dell'anemia presente in corso di AIDS) e che Tat possa, su modelli linfoidi, contrastare l'effetto apoptogeno di TRAIL (*Cell Immunol* 2001, 207:89-99). La complessità della regolazione, Tat-mediata, sulla sopravvivenza cellulare ci ha suggerito di studiare in dettaglio i meccanismi molecolari alla base della di tale effetto biologico, focalizzando il nostro interesse sull'interazione funzionale di Tat sull'azione biologica di TRAIL su un modello linfoide.

Metodi: Il modello cellulare utilizzato è rappresentato dalla linea T CD4+ Jurkat parenterale o transfettata stabilmente con vettori esprimenti Tat e Tat mutato in posizione 22. Le cellule trattate con TRAIL sono state valutate in citometria a flusso per il ciclo cellulare e l'apoptosi. L'espressione delle proteine e la trascrizione dei mRNA specifici di c-FLIP, caspasi-8, caspasi-10 regolato da Tat è stato studiato mediante Western-blot, real-time RT-PCR e slot blot. L'attività di caspasi-8 e -10 è stata analizzata con tecniche ELISA. La presenza di TRAIL nel plasma dei pazienti è stata valutata con saggi ELISA.

Risultati: I risultati hanno dimostrato che le cellule esprimenti Tat inibiscono significativamente l'induzione di apoptosi TRAIL-mediata. L'analisi degli mRNA e l'espressione delle proteine di alcune molecole coinvolte nella regolazione dell'apoptosi indotta da TRAIL hanno evidenziato che, in cellule Jurkat-Tat, caspasi-10 viene regolata negativamente a livello trascrizionale mentre caspasi-8 risulta regolata negativamente nelle cellule esprimenti Tat solo a livello dell'attività enzimatica, suggerendo un coinvolgimento di c-FLIP, in grado di inibire l'attivazione enzimatica della caspasi-8 tramite le sue due isoforme c-FLIPL e c-FLIPS. L'analisi dei trascritti e dell'espressione proteica di c-FLIP ha permesso di osservare un aumento nelle Jurkat esprimenti Tat di entrambe le isoforme.

Conclusioni: I dati ottenuti mostrano uno scenario complesso dove l'induzione dell'apoptosi, TRAIL- mediata, viene contrastata da diversi meccanismi Tat-dipendenti (regolazione dell'espressione di caspasi-10 e di c-FLIP) suggerendo che Tat possa promuovere *in vivo* la sopravvivenza delle cellule infette nella fase precoce dell'infezione, inibendo l'apoptosi innescata da molecole quali TRAIL.

Contributo: 40F.68

LE CELLULE LINFODI PORTATRICI DI DNA PROVIRALE

Elisabetta Riva (*Università “Campus Bio-Medico”, Roma*); Guido Antonelli* (*Università degli Studi di Roma “La Sapienza”*); Ombretta Turriziani (*); Mauro Bucci (*); Giuseppe Forte (*); Francesca Bellomi (*); Carolina Scagnolari (*); Ferdinando Dianzani (*IRCCS L. Spallanzani, Roma*)

Background: Nel corso del progetto siamo stati in grado di dimostrare che le cellule infette rappresentano un efficace marcatore di progressione in quanto il loro numero è direttamente correlato con la viremia plasmatica e inversamente correlato con il numero di CD4. I dati ad oggi ottenuti non consentono tuttavia di stabilire l'esatta proporzione tra cellule latentemente infette e quelle con infezione produttiva. È stato inoltre ampiamente dimostrato che in corso di terapia efficace il compartimento HIV-DNA infetto non diminuisce in maniera proporzionale alla viremia plasmatica. Le ragioni di tale dicotomia sono ancora poco chiare così come non è chiaro se e come la natura del virus all'interno delle cellule possa influenzare la progressione della malattia e/o la risposta al trattamento. Lo studio dei “serbatoi” di HIV rappresenta pertanto un elemento di rilevanza per chiarire alcuni aspetti della patogenesi dell'infezione da HIV.

Metodi: Il numero di cellule infette è stato determinato tramite quantificazione relativa in Real Time PCR eseguita su diluizioni seriali di PBMC. Il numero di copie di HIV-DNA è stato determinato tramite quantificazione assoluta in Real Time PCR eseguita su DNA totale estratto. La determinazione del numero delle cellule produttivamente infette è stata messa a punto tramite quantificazione assoluta in Real Time PCR di specifici mRNA di HIV. La determinazione delle mutazioni associate a resistenza nel plasma e nelle cellule è stata effettuata tramite Trugene HIV-1 (Bayer).

Risultati: La prima parte del progetto è stata dedicata, come previsto, alla messa a punto delle metodiche necessarie allo studio. Per quanto riguarda lo studio dei messaggeri correlati alla replicazione virale è stata messa a punto la metodica e sono stati prodotti gli standard ad RNA necessari alla quantificazione. Il confronto tra cellule infette e copie di HIV-DNA, eseguito su cellule mononucleate di sangue periferico provenienti da 20 soggetti in diverse fasi dell'infezione e/o durante trattamento antiretrovirale, ha messo in evidenza che le due determinazioni corrispondono in circa il 95% dei casi. Lo studio dell'infezione da HIV a livello cellulare è stata anche estesa alla determinazione delle mutazioni associate a farmacoresistenza rilevate contemporaneamente nel plasma e nei PBMC di 13 soggetti pluritrattati. I dati dimostrano che il 62% dei pazienti presenta mutazioni discordanti (MD) per NRTI, il 46% presenta MD per PI e solo il 23% MD per NNRTI. Tre pazienti possiedono mutazioni discordanti per tutte le classi di composti con una media di 7 mutazioni totali per NRTI, 5 mutazioni per PI e 2 mutazioni per NNRTI. Il numero di mutazioni e la discordanza osservata sembrano associati con il tempo di trattamento.

Conclusioni: I dati ottenuti, seppur preliminari, sembrano dimostrare che la determinazione del numero di cellule infette correla con la quantificazione delle copie di HIV-DNA suggerendo che quest'ultimo parametro è sufficientemente rappresentativo della quota di cellule infette. Lo studio delle mutazioni associate a farmacoresistenza dimostra che, almeno in alcuni pazienti, esiste una dicotomia in termini di virus circolante o cellulare-associato. Rimane da chiarire come questo sia legato al fallimento terapeutico e/o alla presenza di replicazione virale nelle cellule. La quantificazione delle cellule produttivamente infette potrebbe aiutare a chiarire questo fenomeno.

Contributo: 40F.69

ROLE OF NATURAL TREG CELLS IN SERONEGATIVE AND HIV-INFECTED INDIVIDUALS

Francesco Annunziato* (*Università degli Studi di Firenze*); Lorenzo Cosmi (*); Enrico Maggi (*); Sergio Romagnani (*)

Background: The general aim of the project was the role of natural Treg cells in healthy subjects and in HIV-infected individuals undergoing or not HAART. Specifically, features of the natural thymic and peripheral Treg cells as well as their ability to exert different regulatory activity on human Th1 or Th2 effector cells were investigated.

Methods: CD4+CD25+ and CD8+CD25+ single positive T cells were purified by immunomagnetism from post-natal human thymuses. The circulating natural Treg cells were evaluated phenotypically by cytofluorimetric analysis gating on CD4+CD25^{high} T cells; they were also purified by sorting procedure to study Foxp3 and GITR mRNA expression. Lastly, in order to establish whether Treg cells exert different regulatory activity on human Th1/Th2 cells, T-cell clones were generated from both CD4+CD25+ and CD8+CD25+ human thymocytes. They were assessed for their ability to suppress the proliferative response to allogeneic stimulation of type 1 Th (Th1) or type 2 Th (Th2) clones derived from autologous CD4+CD25⁻ thymocytes.

Results: We provided data of phenotype, localization, and functional activity of CD4+CD25+ and CD8+CD25+ thymic Treg cells. They represent homogenous cell populations exhibiting: no proliferation in mixed lymphocyte culture, suppression of the proliferative response to allogeneic stimulation of CD4+CD25⁻ T cells, expression of *CTLA-4*, *TNFR2*, and *CCR8*. Following activation, Treg thymocytes did not produce IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , and only a few IL-10, but the majority of them expressed membrane TGF- β and *CTLA4*. These cells acted through a contact-dependent mechanism involving their ability to down-regulate the IL-2R α chain expression in target T cells via the combined action of membrane TGF- β and *CTLA-4*. Indeed the suppressive activity was totally abrogated by neutralizing anti-*CTLA-4* or TGF- β mAbs. Lastly, we provided data that Foxp3, the gene encoding for the key factor of the development of T cell suppressive activity, is selectively expressed by both subsets of human thymic Treg cells. A high variability in the proportions of Treg cells was seen in PBMC of 10 adult healthy donors and 4 HIV-infected patients. Circulating CD4+CD25^{high} T cells displayed a phenotypic profile similar to that exhibited by Treg thymocytes. Sorted circulating CD4+CD25^{high} cells from normal donors displayed high levels of Foxp3 mRNA expression. Low levels of CD25 was found to be constitutively expressed on a small subset of circulating CD8⁺ T cells. Also these circulating CD8+CD25⁺ T cells expressed mRNA for Foxp3, even though at lower levels than in CD4+CD25^{high} T cells. Both Treg cell subsets suppressed the proliferation of Th1 clones, but exhibited significantly lower activity on Th2 clones. The partial suppressive effect on Th2 cells was further reduced by exogenous IL-4, whereas it was increased by anti-IL-4 mAb. The suppressive activity on Th2 cells was completely inhibited by the addition of IL-7, IL-9 and IL-15, but not of IL-2, whereas that on Th1 clones was reverted by the addition of IL-15. This is likely due to the fact that Th2 clones expressed significantly higher amounts of mRNA for IL-4R and IL-9R α chains than Th1 clones, whereas the mRNA expression for IL-2R, IL-7R and IL-15R α chains was comparable.

Conclusions: These findings demonstrate that Th2 cells have a lower susceptibility than Th1 cells to the suppressive activity of human Treg cells.

Grant: 40F.70

INTERAZIONE DI HIV-1 TAT CON L'INTEGRINA AVB3 IN CELLULE ENDOTELIALI: CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA E CONSEGUENZE BIOLOGICHE

Chiara Urbinati* (*Patologia Generale & Immunologia, Università degli Studi di Brescia*); Antonella Bugatti (*); Elena Tanghetti (*); Cosetta Ravelli (*); Domenico Ribatti (*Anatomia Umana, Istologia & Embriologia, Università degli Studi di Bari*); Marco Presta (*); Marco Rusnati (*)

Background: Tat rilasciato da cellule HIV-1+ agisce su diversi tipi cellulari non infettati. La sua interazione con le cellule endoteliali (CE) induce neovascolarizzazione che a sua volta contribuisce a patologie AIDS-associate. L'integrina avb3 è coinvolta nella stimolazione delle CE da parte di Tat. Abbiamo pertanto caratterizzato la trasduzione del segnale e le conseguenze biologiche attivate dall'interazione Tat/avb3 in CE e ne abbiamo identificato possibili antagonisti.

Metodi: L'interazione Tat/avb3 è stata caratterizzata mediante tecnologia BIACORE. Tat immobilizzato a plastica era utilizzato per valutarne la capacità adesiva con diversi tipi di CE. L'attivazione di FAK era valutata mediante Western blot (WB) con anticorpi anti-FAK fosforilato, l'attivazione di NF-kB mediante kit ELISA, l'attivazione di RhoA mediante "pull-down assay" seguito da WB con anticorpi anti-RhoA. CE aderenti a Tat o a proteine controllo venivano valutate per la loro proliferazione, capacità di formare "membrane ruffles" e di riparare il monostrato in seguito a ferita. L'attività angiogenetica di Tat era valutata nel saggio della membrana corion-allantoidea dell'embrione di pollo (CAM). CE trasfettate con avb3 fusa alla "green fluorescein protein" erano fatte aderire a Tat o a proteine controllo ed analizzate in immunofluorescenza per la colocalizzazione di avb3 con secondi messaggeri, componenti del citoscheletro e delle placche di adesione focali (FAP). Alternativamente, le FAP erano isolate ed il loro contenuto analizzato in WB. Per determinare la correlazione tra interazione Tat/avb3, attivazione dei secondi messaggeri e le diverse attività biologiche sono stati utilizzati anticorpi ed inibitori specifici. Il coinvolgimento di FAK era studiato in CE trasfettate con il dominante negativo FRNK. Un composto peptidomimetico (SCH221153) basato sul dominio di riconoscimento integrinico RGD era saggiato per la capacità di inibire le diverse attività biologiche indotte da Tat.

Risultati: L'interazione Tat/avb3 avviene con alta affinità ($K_d = 16$ nM) e rapide cinetiche di associazione/dissociazione. Tat immobilizzato a plastica promuove l'adesione di diversi tipi di CE e l'organizzazione di FAP nelle quali vengono reclutate avb3, KDR, componenti del citoscheletro (paxillina, cortactina) e secondi messaggeri (FAK, pp60src, GRB2). Ciò determina l'attivazione del "pathway" FAK/RhoA/NF-kB a cui, con meccanismi in fase di caratterizzazione, contribuisce anche l'interazione Tat/KDR. Tutto ciò stimola la proliferazione, formazione di "membrane ruffles" e la riparazione del monostrato di CE adese a Tat. L'avb3 antagonista SCH221153 inibisce l'interazione Tat/avb3, la sua capacità cellulo-adesiva, la trasduzione del segnale e risposta biologica delle CE adese a Tat e la neovascolarizzazione indotta da Tat nella CAM. Rispetto a peptidi RGD lineari o ciclici, SCH221153 mostra un'attività Tat-antagonista più potente e specifica.

Conclusioni: Abbiamo caratterizzato biochimicamente l'interazione Tat/avb3 descrivendone le conseguenze biologiche in CE in coltura ed *in vivo*. Ciò, unitamente all'individuazione di antagonisti specifici, identifica l'interazione Tat/avb3 come potenziale bersaglio per lo sviluppo di composti con possibili implicazioni terapeutiche nel trattamento dell'AIDS e di patologie AIDS-associate.

Contributo: 40F.71

ALTERAZIONE DEI MECCANISMI AUTOREGOLATORI DEL SISTEMA IKK/NF-KB DURANTE L'INFEZIONE ERPETICA: EFFETTI SULLA REPLICAZIONE DI HIV

Carla Amici* (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Antonio Rossi** (*CNR*); Antonio Costanzo* (***); Stefania Ciafrè** (*Errore. Il segnalibro non è definito.* (**)); Giuseppe Belardo* (***); Carmen Rozera (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Massimo Levrero (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); M. Gabriella Santoro* (***)

Background: Il virus Herpes Simplex di tipo 1 (HSV-1) è considerato uno dei patogeni responsabili della riattivazione della replicazione di HIV in pazienti sieropositivi; tuttavia il meccanismo alla base della riattivazione retrovirale da parte di HSV-1 non è ancora chiarito. NF-kB, un fattore trascrizionale coinvolto nella regolazione dell'infiammazione e della risposta immunitaria, ha un ruolo essenziale nell'attivazione trascrizionale di HIV. NF-kB è normalmente presente in un complesso citoplasmatico inattivo, legato a proteine inibitorie della famiglia IκB. Vari tipi di stimoli induttori di NF-kB attivano la chinasi IKK, il cui target è la proteina IκBα. In seguito a fosforilazione IκBα è degradata, permettendo la translocazione nucleare di NF-kB e l'induzione della trascrizione di un'ampia varietà di geni tra cui la stessa IκBα che ha funzione di blocco del segnale di attivazione, sequestrando e inattivando NF-kB. Abbiamo recentemente dimostrato che HSV-1 è un potente attivatore di NF-kB in vari tipi di cellule umane. Abbiamo ora identificato i meccanismi molecolari alla base dell'attivazione persistente di NF-kB durante infezione erpetica, ed il ruolo del fattore nella riattivazione retrovirale.

Metodi: Cellule linfoblastoidi umane non infette (CEM-SS e Jurkat) o cronicamente infettate con HIV-1 (ACH-2 e H9) e cheratinociti umani (HaCaT) venivano infettati con HSV-1 (10 PFU/cellula). Il titolo virale veniva determinato mediante saggio TCID₅₀ per HSV-1 e rilevamento di p24 in ELISA per HIV-1. L'attività di NF-kB e della chinasi IKK venivano rilevate mediante analisi EMSA e saggio di chinasi *in vitro* rispettivamente. Il reclutamento di NF-kB su siti kB presenti nei promotori virali e cellulari veniva determinato mediante analisi ChIP. L'attività trascrizionale di geni virali e cellulari veniva determinata in nuclei isolati mediante saggio run-on *in vitro*.

Risultati: Il virus HSV-1 è un potente induttore della chinasi IKK in cellule linfoblastoidi umane, causando l'attivazione di NF-kB nei primi stadi dell'infezione a livelli comparabili a quelli ottenuti con TNFα. Al contrario degli stimoli pro-infiammatori che attivano NF-kB in maniera transiente, in seguito ad infezione con HSV-1 il fattore rimane nello stato attivato con capacità di legare il DNA per 24-48 ore, e causa la transattivazione della trascrizione del virus HIV-1, stimolando la replicazione del virus in cellule cronicamente infette H9 e ACH-2. Attraverso l'uso di una forma "dominant-negative" di IκBα è stato dimostrato un ruolo diretto di NF-kB nella riattivazione di HIV. Studi di run-on *in vitro* ed analisi ChIP hanno dimostrato che la persistenza dell'attivazione di NF-kB è dovuta ad un blocco selettivo della trascrizione di IκBα, a sua volta causato da un mancato reclutamento del fattore sul promotore di IκBα. Al contrario, il fattore viene efficacemente reclutato sui promotori virali.

Conclusioni: I risultati ottenuti dimostrano che il virus HSV-1 è in grado di attivare NF-kB in maniera persistente in cellule linfoblastoidi e che NF-kB ha un ruolo diretto nella riattivazione di HIV in cellule cronicamente infette. Inoltre, l'abilità di HSV-1 di bloccare la sintesi dell'inibitore di NF-kB, interferendo con il reclutamento del fattore sul promotore di IκBα e causando uno stato di attivazione persistente di NF-kB, rivela un ulteriore livello di controllo da parte di un virus sui meccanismi regolatori di base della cellula ospite.

Contributo: 40F.72

SVILUPPO DI UN MODELLO MURINO DI TOPO TRANSGENICO PER LO STUDIO *IN VIVO* DELLA PROTEINA TAT DI HIV-1

Mariateresa De Pascale* (*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*); Teresa Romano Mascia (*) ; Mario Toriello (*) ; Giuseppe Mazzarella** (*CNR, Avellino*); Rosita Stefanile (**); Flavio D. Caridi (*) ; Mariangela Capone (*) ; Annunziata Cammisa (*) ; Luigi Racioppi (*) ; Giuseppe Scala (*)

Background: La proteina Tat di HIV-1 regola la trascrizione dei geni virali e modula l'espressione di geni cellulari codificanti per fattori di crescita e differenziamento di cellule linfoidi. La patologia AIDS è caratterizzata da una ridotta produzione di progenitori linfoidi T, da un rapido declino di cellule T CD4+ e da un aumento di cellule TregCD4+CD25+. Queste evidenze suggeriscono che Tat possa essere direttamente coinvolta nello sviluppo della patologia AIDS. Per testare questa possibilità è stato sviluppato un modello murino transgenico per il gene tat di HIV-1.

Metodi: Sono stati sviluppati due ceppi murini nei quali l'espressione di Tat è ristretta al sistema linfomonocitario; infatti, la trascrizione del transgene è regolata dal promotore H-2k del complesso maggiore di istocompatibilità e dell'enhancer E-u della catena pesante delle immunoglobuline.

Risultati: L'espressione tessuto-specifica di tat è stata analizzata mediante Northern blots e RT-PCR. I ceppi transgenici mostrano la tendenza ad una elevata mortalità pre- e post-natale e un periodo di svezzamento protratto accompagnato da un ridotto peso corporeo nei primi due mesi di vita. Inoltre in molti casi il Timo risulta di dimensioni notevolmente ridotte rispetto ai controlli, in particolare nei topi più giovani. I risultati ottenuti per citofluorimetria e per istochimica mostrano che l'espressione di tat è responsabile di un invecchiamento timico precoce che si evidenzia con la perdita della struttura lobulare tipica del timo e con la comparsa di tessuto adiposo, nonché con un aumento dell'espressione di CD25 sui linfociti e una forte riduzione dei linfociti CD4+CD8+.

Conclusioni: I risultati ottenuti evidenziano un ruolo di Tat nella disregolazione del differenziamento e sopravvivenza di cellule linfoidi T *in vivo* e puntano ad un modello murino che mima la patologia immunitaria delle cellule T associata allo sviluppo di AIDS. Tale modello permette un'analisi dettagliata delle interazioni tra proteine cellulari e Tat.

Contributo: 40F.73

NUOVO APPROCCIO PER LA CARATTERIZZAZIONE DEGLI ISOLATI VIRALI NELLA PROGRESSIONE DI MALATTIA IN BAMBINI HIV-1 INFETTI

Mariangela Cavarelli* (*DIBIT, Milano*); Chiara Ripamonti (*); Ingrid Karlsson** (*Lund University*); Liselotte Antonsson (**); Anna Plebani (*Clinica De Marchi*); Eva Maria Fenyo (**); Gabriella Scarlatti (*)

Background: L'infezione da HIV-1 nel bambino presenta manifestazioni cliniche variabili. I sintomi caratteristici dell'AIDS si manifestano entro il primo anno di vita nei cosiddetti bambini "fast progressors" (FP), mentre la malattia evolve più lentamente negli "slow progressors" (SP), i quali non manifestano sintomi evidenti per diversi anni. Un importante tratto fenotipico associato alla patogenesi è il tipo di corecettore utilizzato dal virus per infettare la cellula ospite. Generalmente gli isolati virali presenti nella fase precoce dell'infezione utilizzano come corecettore CCR5. Con il progredire della malattia può verificarsi la comparsa di isolati virali in grado di utilizzare CXCR4, da solo o in associazione con il CCR5. Recentemente sono stati sviluppati corecettori chimerici tra il CCR5 ed il CXCR4, ottenuti mediante la sostituzione di porzioni via via crescenti del CCR5 con le corrispondenti parti del CXCR4. L'utilizzo di cellule esprimenti tali recettori ha permesso di dimostrare negli adulti che durante il processo patogenico gli isolati R5 evolvono verso un uso più efficiente del CCR5 e che la comparsa di isolati che utilizzano i recettori chimerici per infettare la cellula ospite è associata a progressione di malattia. Ci siamo pertanto chiesti se un pattern di evoluzione simile sia osservabile anche in ambito pediatrico.

Metodi: 81 isolati sequenziali ottenuti da 13 bambini HIV-1 positivi, di cui 8 SP e 5 FP, sono stati testati per la loro capacità di infettare le cellule U87. CD4+ esprimenti il recettore wild-type (CCR5 o CXCR4) oppure uno dei sei recettori chimerici (FC1, FC2, FC4b, FC5, FC6, FC7). È stata inoltre valutata la sensibilità degli isolati all'inibizione da parte della chemochina RANTES.

Risultati: All'interno del fenotipo R5 è possibile fare una distinzione fra i virus in grado di usare esclusivamente il CCR5 (R5_{narrow}) e quelli che invece utilizzano almeno un recettore chimerico oltre al CCR5 (R5_{broad}). L'analisi fenotipica ha dimostrato che tutti i bambini SP presentano un virus R5_{narrow} nei primi mesi di vita. In un solo caso il fenotipo narrow permane durante la progressione di malattia, mentre in due bambini il virus evolve verso il fenotipo R5_{broad} ed in 5 compaiono varianti che utilizzano il CXCR4. Due dei cinque bambini FP presentano un virus R5_{narrow} alla nascita, due un R5_{broad} ed uno un R5X4. Il fenotipo R5_{narrow} in un caso acquisisce la capacità di usare i recettori chimerici (R5_{broad}). I due bambini con un virus R5_{broad} alla nascita sviluppano varianti che utilizzano il CXCR4, mentre l'unico bambino con un virus R5X4 alla nascita non mostra cambiamenti fenotipici durante il follow-up. È stato notato che i virus R5 dei bambini che sviluppano varianti virali in grado di usare il CXCR4 sono più sensibili a RANTES rispetto ai virus R5 dei bambini che non evolvono verso il CXCR4. Non sembra che ci sia una differenza significativa nella sensibilità all'inibizione da RANTES tra gli isolati R5_{narrow} e quelli R5_{broad}.

Conclusioni: I nostri risultati dimostrano che l'utilizzo di recettori chimerici nella prima fase dell'infezione da HIV-1 è strettamente correlato ad una più rapida progressione di malattia. Inoltre l'evoluzione verso l'uso del CXCR4 è caratterizzata dalla presenza di varianti virali precoci R5 altamente sensibili a RANTES. I nostri risultati hanno rilevanti implicazioni per l'intervento terapeutico con farmaci inibenti il CCR5.

Contributo: 40F.74

UN COMPLESSO NETWORK CHEMIOCHINICO DIRIGE LA MIGRAZIONE DELLE CELLULE T CD8+ NEL POLMONE DEI SOGGETTI SIEROPOSITIVI PER HIV

Carlo Agostini* (*Università degli Studi di Padova*); Monica Facco (*) ; Ilenia Baesso (*) ; Marta Miorin (*) ; Anna Cabrelle (*) ; Antonio Vendrame (*) ; Livio Trentin (*) ; Renato Zambello (*Azienda Ospedaliera di Padova*) ; Gianpietro Semenzato (*)

Background: Nelle fasi iniziali dell'infezione, il virus HIV provoca una malattia interstiziale polmonare caratterizzata da una marcata infiltrazione di linfociti T citotossici (CTL) CXCR3+/CD8+, a livello dell'interstizio e degli spazi alveolari. In questo studio abbiamo valutato il ruolo fisiopatologico di due chemiochine linfotattiche, la CC-chemiochina CCL20 e la CXC-chemiochina CXCL16, in grado di guidare la migrazione delle cellule Th1/Tc1 nel polmone. Queste chemiochine interagiscono con specifici recettori: CCL20 è l'unico ligando chemiochinico noto di CCR6, mentre CXCL16 si lega specificatamente a CXCR6/Bonzo.

Metodi: La valutazione dell'espressione delle chemiochine e dei loro recettori è stata effettuata mediante analisi citofluorimetriche e molecolari delle cellule polmonari, ottenute mediante la tecnica del broncolavaggio alveolare (BAL), e del sangue periferico, di soggetti sieropositivi per HIV e controlli normali.

Risultati: I linfociti T polmonari, ottenuti dal BAL effettuato su 10 pazienti, sieropositivi per HIV e con alveolite linfocitaria, erano cellule CXCR3+/CD8+, caratterizzate dalla coespressione di elevati livelli di CCR6 (83,43±7,80% dei linfociti T CD8+/CXCR3+, intensità media di fluorescenza, MFI: 100,29±28,12) e, in misura minore, di CXCR6/Bonzo (48,25±11,80% delle cellule T CD8+/CXCR3+, MFI: 48,33±17,12). L'analisi molecolare degli mRNA ha confermato l'espressione genica dei due recettori. I linfociti T polmonari, ottenuti da pazienti sieropositivi per HIV, ma senza alveolite (6), e da soggetti normali (4), erano privi, od esprimevano livelli molto bassi, di CCR6 e di CXCR6. I linfociti T CD8+ ottenuti dal sangue periferico dei soggetti sieropositivi per HIV esprimevano livelli apprezzabili di CCR6 (51,50±0,71% delle cellule T CD8+, MFI: 25,50±3,54), mentre il recettore non era espresso dai linfociti T CD8+ periferici dei soggetti normali. CXCR6 non era presente nei linfociti T periferici né dei pazienti HIV-positivi né dei controlli. Infine, attraverso l'analisi dell'mRNA, abbiamo dimostrato che i macrofagi alveolari ottenuti dai pazienti sieropositivi per HIV e con alveolite linfocitaria, esprimevano le chemiochine CCL20 e CXCL16.

Conclusioni: Nel loro complesso, i nostri dati suggeriscono un diretto coinvolgimento degli assi CCL20/CCR6 e CXCL16/CXCR6 nella patogenesi dell'alveolite sostenuta da CTL HIV-specifici, nel polmone dei pazienti sieropositivi per HIV.

Contributo: 40F.75

RUOLO DI HLA-C NELLA INFEZIONE DA HIV

Antonio G. Siccardi (*Università degli Studi di Milano*); Elisa Soprana* (*DIBIT, Ospedale San Raffaele, Milano*); Miriam Baroni (*); Gabriella Scarlatti (*)

Background: Con nuovi approcci metodologici, vogliamo dimostrare in modo conclusivo l'esistenza di interazione tra HLA-C e proteine env, e la loro funzione. Le linee di ricerca proposte sono tre: 1) silenziamento di HLA-C mediante RNA interference e valutazione dell'infettabilità delle cellule silenziate da parte di HIV-1, per validare in tipi cellulari che siano gli ospiti "fisiologici" di HIV i risultati ottenuti in passato su linee B-linfoblastoidi manipolate geneticamente; 2) analisi della composizione del complesso di fusione, con reagenti che permettano di dimostrare direttamente una interazione tra gp41 e HLA-C; e 3) analisi della composizione proteica dei raft nelle membrane dei virioni, per comprendere la rilevanza della localizzazione in microdomini di membrana dei vari partner del processo di fusione (inclusa HLA-C).

Metodi: 1) Abbiamo progettato tre siRNA specifici per HLA-C e ne abbiamo valutato l'attività su una linea cellulare (che cresce adesa) positiva sia con L31, un anticorpo specifico per HLA-C "vuoto", cioè privo di peptide antigenico, che con W6/32, un anticorpo specifico per HLA-A, -B e -C carichi di peptide antigenico. Dobbiamo ora mettere a punto la trasfezione dei siRNA nelle cellule in sospensione e in particolare in linfociti e monociti.

2) Abbiamo messo a punto un saggio citofluorimetrico di neutralizzazione di HIV basato sulla colorazione intracellulare di p24 in cellule infette: vengono infettati (a bassa m.o.) linfociti o monociti (dal sangue periferico umano) trattati con un inibitore della proteasi. A 48 ore p.i., le cellule vengono fissate, permeabilizzate e colorate per p24 intracellulare.

3) Abbiamo messo a punto metodi di frazionamento delle membrane cellulari dopo trattamento con diverse concentrazioni di detergente che permettono di separare frazioni arricchite di raft con differenti composizioni proteiche.

Risultati: 1) L'attività dei siRNA è risultata largamente selettiva per le molecole di HLA-C.

2) Nel saggio di neutralizzazione, che non permette che un ciclo di replicazione, in quanto i virioni prodotti in presenza di inibitore non sono infettivi, il rapporto dose virale/effetto (cioè percentuale di cellule p24-positive) è lineare (fino al 3-5% di cellule infette), per cui l'effetto neutralizzante di vari inibitori, e in particolare del silenziamento di HLA-C, può essere valutato precisamente in termini di "dose reduction".

3) La composizione proteica dei raft viene analizzata con anticorpi specifici per CD4, CCR5, HLA-C e HIV env. Si dimostra l'arricchimento selettivo di raft in seguito a cross-linking con i ligandi rilevanti (gp120 e gp41).

Conclusioni: La maggior parte delle metodologie necessarie per il progetto sono state messe a punto. Nei prossimi mesi procederemo ad effettuare gli esperimenti per dimostrare in modo conclusivo l'esistenza di interazione tra HLA-C e proteine env, e la loro funzione.

Contributo: 40F.76

ATTIVITÀ CITOTOSSICA NATURALE IN PAZIENTI CON SARCOMA DI KAPOSÌ

Maria Caterina Sirianni* (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Massimo Campagna (*); Maurizio Carbonari (*); Paolo Monini** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Barbara Ensoli (**)

Background: Il Sarcoma di Kaposi (KS) è raro in ospiti immunocompetenti ma ha elevata incidenza in pazienti immunocompromessi, quali gli infetti dal virus HIV. Il KS è sempre associato allo 'Human Herpesvirus type 8' (HHV8), che infetta latentemente monociti, linfociti e cellule KS, ed interferisce con la risposta immune, anche riducendo l'espressione di superficie di molecole di MHC-I nelle cellule infette, le quali divengono, tuttavia, target ideali per le cellule natural killer (NK). In accordo con questi dati, abbiamo già dimostrato come le cellule NK di donatori normali siano in grado di riconoscere come bersaglio preferenziale cellule latentemente infette da HHV8 (Sirianni *et al.*, Eur. J. Immunol., 2002). Tuttavia, i soggetti con AIDS-KS mostrano una significativa riduzione dell'attività NK. Scopo del presente studio è caratterizzare il comparto delle cellule NK in soggetti HHV8-infetti, con KS o a rischio di KS, e chiarire il ruolo delle stesse nel controllo dell'infezione da HHV8 e nell'insorgenza e nella progressione del KS.

Metodi: Sono stati studiati 3 gruppi di soggetti: 30 donatori normali (NBDs), sia HIV che HHV8 negativi, un gruppo di 10 pazienti HHV8-positivi con AIDS-KS, e 20 pazienti HHV8-positivi con KS classico (C-KS). Il fenotipo delle NK di questi soggetti è stato caratterizzato mediante l'uso di anticorpi monoclonali (mAbs), immunofluorescenza (IFL) indiretta e successiva citometria a flusso, tramite citometro FACSCalibur (Becton-Dickinson, B-D). Attraverso tripla o quadrupla IFL sono state ricercate le seguenti molecole di superficie: CD3, CD56, CD8 (evidenziate mediante mAbs della B-D), CD158a (KIR2DL1), CD158b (KIR2DL2/3) e CD94 (Immunotech). Il corredo intracitoplasmatico in granzyme A e perforina è stato esaminato mediante kits commerciali (B-D), ottimizzando la metodica di permeabilizzazione e fissazione secondo parametri messi a punto nel corso di questo studio. L'attività NK è stata valutata mediante la tecnica del rilascio del Cromo51 dalla linea K562 e, ove possibile, da linee cellulari latentemente infette da HHV8, derivate da linfomi ad effusione primaria.

Risultati: Rispetto ai NBD, sia i pazienti con AIDS-KS che i pazienti con C-KS presentano un incremento delle cellule NK (CD3-CD56+), con una distribuzione normale dei sottotipi CD56 'dim' e 'bright'. Le cellule CD56dim esprimono i recettori inibitori KIR2DL1 e KIR2DL2/3, mentre il recettore inibitorio CD94 è prevalentemente espresso dalle cellule CD56bright. Il KIR2DL2/3, tuttavia, era espresso anche da cellule T (CD3+CD56-) dei pazienti con AIDS-KS. Il corredo di enzimi intracitoplasmatici era ben distribuito all'interno delle NK in tutti i gruppi in studio. Tuttavia, i pazienti con AIDS-KS hanno presentato, globalmente, un'attività citotossica significativamente ridotta ($p < 0.001$ rispetto ai NBD ed ai C-KS) sia verso la linea K562 che verso le linee HHV8-infette.

Conclusioni: I risultati ottenuti confermano che cellule latentemente infette da HHV8 e con scarsa espressione di molecole MHC-I di superficie sono sensibili alla lisi mediata dalle NK. La diminuita attività NK nei soggetti con AIDS-KS sembra svolgere un ruolo chiave nell'aumentata incidenza ed aggressività del KS nei soggetti HIV-infetti, a causa del ridotto controllo dell'infezione latente da HHV8 da parte del sistema immune. La diminuita attività NK in corso di AIDS-KS è mediata, almeno in parte, da un'aumentata espressione di cellule con recettori inibitori.

Contributo: 40F.77

EFFETTI DI DIFFERENTI MUTAZIONI NELLA RT DI HIV-1 SULLA FITNESS VIRALE E SULLA RESISTENZA MULTIPLA A INIBITORI NUCLEOSIDICI E NON-NUCLEOSIDICI

Giovanni Maga* (*IGM, CNR*); Emmanuele Crespan (*); Stefania Paolucci** (*IRCCS S. Matteo, Pavia*); Fausto Baldanti (**); Giada Locatelli (*); Reynel Cancio (*); Giuseppe Gerna (**); Silvio Spadari (*)

Background: Con lo scopo di porre le basi per lo sviluppo di un approccio farmacogenetico al trattamento delle infezioni da HIV, partendo dai dati genotipici di coorti di pazienti selezionate e con una storia clinica nota, disponibili presso il laboratorio del nostro collaboratore Prof. Gerna, del Policlinico S. Matteo di Pavia, il nostro progetto si è posto i seguenti obiettivi:

- 1) Identificare nuovi schemi di resistenza incrociata investigando l'impatto di mutazioni selezionate da una classe di agenti retrovirali (ad es. NRTIs) sull'efficacia di inibitori di altre classi (ad es. NNRTIs).
- 2) Identificare nuove mutazioni di resistenza attraverso la meta-analisi dei dati genotipici per la trascrittasi inversa (RT) di sottopopolazioni virali isolate da coorti di pazienti AIDS selezionate in base a criteri specifici incrociata con le informazioni relative ai farmaci cui queste sottopopolazioni sono state esposte.
- 3) Fornire una correlazione quantitativa tra genotipo virale (a livello del gene della RT), resistenza ai farmaci antiretrovirali e fitness del virus mutante.

Metodi: Mutazioni selezionate sono state introdotte per mutagenesi sito-specifica nel gene della RT di HIV-1. Le sequenze codificanti la RT contenente le diverse mutazioni sono state introdotte in un vettore di espressione e i corrispondenti enzimi mutati sono stati espressi in forma ricombinante e purificati per cromatografia di affinità. L'analisi enzimatica è stata effettuata tramite saggi di retrotrascrizione *in vitro*.

Risultati: È stato analizzato l'impatto di differenti mutazioni nel sito di legame dei nucleotidi della RT di HIV-1 sui meccanismi di resistenza a NRTIs e NNRTIs. Le mutazioni prese in esame sono state: D113E, Y115F, F116Y, Q145L/M, Q151E/M/N, M184V. L'analisi enzimologica ha permesso di evidenziare che le mutazioni Q151E/M/N e M184V conferivano una moderata ipersensibilità (2 -3 volte) a NNRTIs (efavirenz, nevirapina). Tuttavia, le mutazioni alla posizione Q151 abrogavano completamente la capacità di NNRTIs (efavirenz) di inibire la rimozione fosforolitica di stavudina e zidovudina monofosfato (d4TMP, AZTMP). Nessuna di queste mutazioni mostrava un impatto significativo sull'efficienza catalitica della RT. Al contrario, le mutazioni Q145M/L conferivano resistenza incrociata a NNRTIs e NRTIs, a spese, tuttavia, di una severa riduzione dell'efficienza catalitica della RT.

Conclusioni: Mutazioni di resistenza a NRTIs (Q151E/M/L e M184V) della RT di HIV-1 si sono dimostrate in grado di alterare la risposta anche verso NNRTIs. In particolare, mutazioni alla posizione Q151 da un lato conferivano un modesto aumento di sensibilità a NNRTIs, dall'altra abrogavano completamente la sinergia tra NRTIs e NNRTIs, impedendo a questi ultimi di inibire la rimozione fosforolitica di AZTMP e d4TMP. Inoltre, è stata dimostrata un'ottima correlazione tra fenotipo virale (riduzione della fitness e resistenza multipla a NRTIs e NNRTIs) e fenotipo enzimatico (riduzione dell'efficienza catalitica e ridotta sensibilità a NRTIs e NNRTIs) per le mutazioni Q145M/L nella RT di HIV-1. Questi risultati, permettono a tutti gli effetti di parlare di resistenze incrociate INTER-classe, evidenziando come mutazioni della RT selezionate da una particolare classe di inibitori, influenzino la risposta anche a farmaci di altre classi e possano riflettersi, a volte in modo non prevedibile, su molteplici caratteristiche enzimatiche, con differente impatto sulla fitness virale.

Contributo: 40F.78

IL RECETTORE CHEMOCHINICO CCR5 È ESPRESSO SULLA MEMBRANA CELLULARE DEGLI SPERMATOZOI UMANI

Barbara Muciaccia* (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Fabrizio Padula (*); Loredana Gandini (*); Elena Vicini (*); Andrea Lenzi (*); Mario Stefanini (*)

Background: Sebbene la presenza del virus HIV-1 negli spermatozoi sia stata dimostrata mediante PCR in situ e microscopia elettronica (Bagasra *et al.* AIDS 1994, 8:1669; Baccetti *et al.* J Cell Biol 1994, 127:903), l'infezione degli spermatozoi stessi e la presenza del CD4 sulla loro membrana rimangono argomenti molto controversi (Alexander NJ. J Reprod Immunol 1998, 41:17). Tuttavia, è ben noto che nel corso di infezione da HIV-1 il virus è presente nel seme come virione libero nel plasma seminale, in leucociti infetti, nonché adeso alla superficie degli spermatozoi (Borzy *et al.* J Acquir Immune Defic Syndr 1988, 1:419; Dejuq-Rainsford N *et al.* Curr Pharm Des 2004, 10:557). Finora nessun recettore chemochinico è stato riportato essere espresso sulla superficie degli spermatozoi umani. Riportiamo dati ottenuti mediante vari approcci sperimentali che dimostrano la presenza del recettore chemochinico CCR5 sulla membrana degli spermatozoi umani eiaculati.

Metodi: Abbiamo studiato la presenza del recettore beta-chemochinico CCR5 sulla superficie di spermatozoi eiaculati di 25 soggetti normozoospermici sani, mediante analisi citofluorimetrica, microscopia ad immunofluorescenza e Western Blotting utilizzando anticorpi monoclonali specifici. In 5 soggetti abbiamo inoltre eseguito l'analisi molecolare per la delezione Delta32 del gene per CCR5, mediante PCR e nested PCR.

Risultati: L'analisi citometrica ha dimostrato la presenza del CCR5 sulla superficie degli spermatozoi nel 92% dei soggetti studiati. Gli esperimenti di immunofluorescenza hanno quindi consentito di localizzare il CCR5 nella regione periacrosomiale della membrana cellulare ed il Western Blotting ha confermato la presenza di una banda immunoreattiva corrispondente al peso molecolare atteso per CCR5. L'espressione del CCR5 era diversa nei vari soggetti studiati. Infatti in 19 soggetti, dal 25% al 50% degli spermatozoi apparivano positivi per CCR5, mentre nei rimanenti casi gli spermatozoi erano tutti positivi (4 casi) o tutti negativi (2 casi). L'analisi del genotipo ha dimostrato la presenza della mutazione Delta32 del gene CCR5 allo stato eterozigotico (Delta32+/-) in un soggetto che esprimeva CCR5 nel 50% degli spermatozoi eiaculati.

Conclusioni: I nostri dati dimostrano, per la prima volta, la presenza di CCR5 nella regione periacrosomiale degli spermatozoi eiaculati di soggetti sani normozoospermici e che la mancanza di questo recettore chemochinico può essere dovuta a mutazioni del gene (Muciaccia *et al.* AIDS 2005 in press). Sebbene sia stato riportato che il seme di soggetti sieropositivi per HIV-1 contiene virus adesi alla superficie degli spermatozoi, i meccanismi molecolari dell'interazione virus-spermatozoo non sono stati definiti. CCR5 espresso sulla membrana dello spermatozoo può costituire, da solo o in associazione con altre molecole, il complesso recettoriale responsabile dell'adesione del virus allo spermatozoo che consente a questa cellula di funzionare quale carrier virale durante la trasmissione dell'infezione per via sessuale. Infine la presenza del CCR5 sulla membrana degli spermatozoi di soggetti sani suggerisce che questo recettore chemochinico debba avere un ruolo nella fisiologia della riproduzione.

Contributo: 40F.79

PATOGENESI DI MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE IN MODELLI ANIMALI SPERIMENTALI DI SCIMMIA E CONIGLI

Maria Teresa Maggiorella* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Federica Crostarosa (*); Leonardo Sernicola (*); Stefania Farcomeni (*); Fausto Titti (*)

Background: L'infezione da SIV o HIV con o senza co-infezione con EBV, e più recentemente, l'infezione con SRV-2 (retrovirus Type D) sono state associate all'insorgenza di neoplasie nei rispettivi ospiti ma il loro ruolo patogenetico non è stato del tutto chiarito. A tal fine, gli obiettivi principali limitatamente al primo anno del progetto erano:

- A. Patogenesi dei linfomi associati all'infezione di SIV/HIV.
- B. SRV-2 e malattie linfoproliferative.
- C. Sviluppo del modello animale di infezione con EBV-like e HIV in conigli.
- D. Sviluppo del modello animale di infezione con EBV-like in Primati non umani (*Macaca fascicularis*).

Metodi: Il sequenziamento del gene Nef è stato fatto dopo clonaggio secondo protocolli standardizzati nel nostro laboratorio. Linee linfoblastoidi sono state ottenute sia da PBMC di scimmia che dopo infezione *in vitro* con EBV/SRV-2 senza l'aggiunta di fattori di crescita esogeni.

Risultati: A: Patogenesi dei linfomi associati all'infezione di SIV/HIV. Abbiamo già dimostrato la presenza di SIV in cellule tumorali T e B di scimmia e che SIV *in vitro* induce una infezione non citolitica, con meccanismo CD4/CXCR4/CCR5- indipendente in cellule B di scimmie. Studi di sequenziamento del gene Nef di SIV presente nelle cellule tumorali, ha rilevato la presenza di mutazioni e/o delezioni suggerendo la presenza di un virus con fenotipo attenuato. Dunque SIV competente per la replicazione ma non citolitico, induce una stimolazione antigenica cronica che, verosimilmente insieme ad altri fattori, può essere associata ad insorgenza di neoplasie. Questa ipotesi è confermata da una analisi retrospettiva su linfonodi di scimmie vaccinate con SIV vivo ma attenuato (delezione nel gene Nef). Infatti infiltrati di cellule tumorali sono stati osservati in una scimmia vaccinata. Allo scopo di studiare *in vitro* gli effetti dei singoli geni su cellule trasformate in presenza od in assenza di virus confettanti (EBV-like e SRV-2) pDNAs esprimenti geni strutturali e regolatori di SIV sono stati preparati ed espansi per studi *in vitro* su linee cellulari di scimmia da noi stabilizzate. In particolare da una di queste linee producenti EBV-like (negativa per SIV, STLV e SRV-2) abbiamo prodotto uno stock di virus per studi di linfomagenesi *in vivo* (obiettivo D)C. Sviluppo del modello animale di infezione con EBV-like e HIV in conigli. L'inoculo sottocute di cellule irradiate di scimmia producenti EBV-like ha indotto nei conigli linfomi a fenotipo T (CD25+, CD4+) nell'arco di tempo di 3-6 mesi. L'associazione tra linfomi ed EBV-like è dimostrata dalla presenza di trascritti (EBER) di EBV e di proteine di virali (LMP-1, VCA, EBNA-2) nei tessuti del coniglio. In particolare da un coniglio sono state stabilizzate *in vitro* due linee tumorali che presentano caratteristiche diverse sulla base della loro origine. Infatti il genoma di EBV-like, la produzione di IL-10 è stabilmente presente solo in MR1 (derivate da milza) ma non in PR1 (derivate da PBMC). Inoltre EBV-like prodotto da MR1 è capace di infettare/trasformare cellule di coniglio ma non cellule di scimmia suggerendo una modificazione del tropismo virale.

Conclusioni: La presenza di SIV con fenotipo attenuato in linfomi di scimmia è un dato ulteriore sul coinvolgimento di SIV/HIV nel processo linfomagenico. L'isolamento di EBV-like offre la possibilità di studiare in modelli preclinici la patogenesi dell'infezione e la possibile insorgenza di neoplasie EBV-associate.

Contributo: 40F/N

PATHWAY DI SEGNALE INDOTTI DA TAT NELLA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE

Elena Toschi* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Ilaria Bacigalupo (*) ; Raffaele Strippoli** (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Anna Cereseto (*Scuola Normale Superiore, Pisa*); Mario Falchi (*) ; Cecilia Sgadari (*) ; Giovanni Barillari (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Filomena Nappi (*) ; Fabrizio Mainiero (**); Barbara Ensoli (*)

Background: Tat di HIV-1 svolge un ruolo importante nel determinare la frequenza e l'aggressività che caratterizzano il sarcoma di Kaposi (KS) associato ad AIDS. Essa viene rilasciata dalle cellule T acutamente infettate e, in questa forma, agisce come fattore di progressione inducendo crescita, migrazione ed invasione di cellule KS e di cellule endoteliali (EC) attivate con citochine di tipo Th-1. Correlato a ciò si è osservato che Tat, in sinergia con bFGF, promuove angiogenesi, permeabilità vascolare ed edema *in vivo*. Un ruolo chiave in questi fenomeni sembra essere giocato, almeno in parte, dal legame della regione RGD di Tat alle integrine $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$. È noto che l'adesione cellulare mediata da integrine può indurre varie cascate di traduzione del segnale, tra cui l'attivazione del pathway Ras/MAPK, implicato nei fenomeni di proliferazione. Poiché le conoscenze relative al pathway di segnale che legano Tat alla regolazione delle funzioni cellulari da essa indotte non sono completamente noti, scopo di questo studio è indagare se Tat induca la fosforilazione di proteine coinvolte nella cascata Ras/ERK MAPK in EC e quali siano i conseguenti effetti funzionali.

Metodi: Modelli cellulari: EC umane primarie (HUVEC); linea endoteliale immortalizzata (EA-hy 926). Attivazione di Ras e Rac: analisi dei lisati di cellule stimolate con Tat mediante pull-down assay specifici. Attivazione di ERK: western blot su lisati da cellule stimolate con Tat o suoi peptidi con un anticorpo specifico per ERK fosforilato. Valutazione del ruolo di Ras e Rac nell'attivazione di ERK: trasfezione delle cellule con siRNA oligonucleotidi per bloccare l'espressione di Ras o Rac e verifica della fosforilazione di ERK sulle cellule stimolate mediante western blot.

Risultati: La stimolazione con Tat coniugato a beads di lattice di cellule rese silenti mediante starvation e la successiva analisi dell'attivazione di Ras e Rac ha evidenziato che Tat, come la fibronectina, è in grado di attivare entrambe queste GTPasi. Si è osservato inoltre che Tat induce fosforilazione di ERK sia in HUVEC che in EA-hy 926, ed il segnale in queste ultime sembra essere più persistente. Ulteriori esperimenti hanno messo in luce che la regione RGD di Tat sarebbe principalmente responsabile dell'attivazione di ERK. Mediante la metodica di RNA interference è stata quindi bloccata l'espressione di Ras e Rac e, successivamente, si è analizzato se la fosforilazione di ERK sia consequenziale all'attivazione di Ras o Rac. I risultati ottenuti indicano che il blocco di Ras, e non quello di Rac, sono determinati per l'attivazione di ERK.

Conclusioni: Molteplici evidenze suggeriscono l'importanza di Tat nello sviluppo e soprattutto nella progressione dell'AIDS-KS, e questi risultati preliminari contribuiscono a meglio definirne i meccanismi. In particolare, l'induzione della cascata di segnale Ras/ERK, come dimostrato dall'attivazione correlata delle due proteine, indica specifici meccanismi di segnalazione grazie a cui Tat, mediante il domain RGD, può stimolare la proliferazione cellulare. Future indagini sono comunque necessarie per meglio delineare il pathway. A tale proposito, si studierà quali altre proteine a monte di Ras possano essere indotte da Tat. Inoltre, poiché l'adesione a fibronectina in presenza di un forte mitogeno stimola le cellule a progredire nel ciclo, ci si propone di verificare, se Tat, da solo od in associazione con bFGF, possa indurre ingresso in ciclo di cellule bloccate in G0 e se ciò sia dipendente da ERK.

Contributo: 40F/O

A SOLUBLE FACTOR SECERNED FROM LPS-STIMULATED MACROPHAGES SUPPRESSED CXCR4 TROPIC HIV-1 REPLICATION

Joanna Mikulak* (*DIBIT, Milano*); Gianfranco Pancino (*Institut Pasteur, Paris*); Paolo Lusso (*); Alessia Verani (*)

Background: A wide variety of stimuli have been found to suppress HIV strongly through macrophage activation, pointing towards a macrophage-associated antiviral activity. Several results corroborate this hypothesis. Urokinase-urokinase receptor interactions, CD40-CD40L interactions, stimulation through Fc gamma-R, and stimulation with bacterial lipopolysaccharide (LPS) have all been reported to inhibit HIV-1 replication in macrophages. Bacterial LPS protects primary human macrophages from infection by CCR5-tropic (R5) HIV-1 isolates through the release of the CC chemokines RANTES, macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, and MIP-1beta. In addition, LPS suppresses infection of macrophages by CXCR4-tropic (X4) HIV-1 isolates. A marked downregulation of both CD4 and CXCR4 expression was associated with this effect. Furthermore, soluble factor(s) released by macrophages upon LPS treatment inhibited infection with X4 viruses in both macrophages and T lymphocytes. We have performed a detailed characterization of the LPS-induced HIV-suppressive activity.

Methods: PBMC were isolated by density gradient centrifugation from buffy coat of healthy donors. MDM were purified by 5-day adherence. MDM were infected with primary HIV-1 isolates (TCID50: 50/million cells) that use CCR5 or CXCR4. HIV-1 p24 antigen concentrations in culture supernatants were determined by ELISA. The beta-chemokines MIP-1beta and RANTES, as well as secretion of IL-12, TNF-alpha, IL-4, IL-16, IL-10, and IFN-gamma, were quantified in culture supernatants by using a sandwich ELISA.

Results: Soluble suppressive factor(s) released by MDM upon LPS stimulation blocked infection of both macrophages and T cells at the level of viral entry. LPS-mediated inhibition of HIV-1 occurred regardless of coreceptor tropism and virus subtypes, and was unrelated to the release of IL-16, IFN-gamma, and defensins. In addition, the protease inhibitor leupeptin, that is reported to block the antiviral activity of CD8 antiviral factor (CAF), didn't affect the HIV suppression induced by LPS. We also observed that the suppressive activity was sensitive to proteinase K and heat treatment, and appeared to be preformed within cells, in that it was not inhibited by cycloheximide. Interestingly, pretreatment with the protein tyrosine kinase-specific inhibitor genistein, which effectively blocks LPS-induced NF-kB activation, didn't interfere with the secretion of the HIV suppressive factor by MDM, while it markedly reduced the release of TNF-alpha.

Conclusions: Our results clearly illustrate the dual role that macrophages play in HIV infection, as they sustain long-term HIV persistence and replication, but at the same time can dramatically suppress the spread of HIV to both MDM and T cells following activation by bacterial pathogens. The observation that soluble factors produced by LPS-treated macrophages inhibit the entry of X4 HIV-1 isolates strongly point to the existence of a soluble HIV-1 suppressive factor(s), distinct by CAF, which has yet to be identified. The identification of these putative HIV-suppressive molecule(s) will have significant implications for our understanding of the mechanisms of HIV control *in vivo*, as well as for the development of novel therapeutic approaches.

Grant: 40F.80

STUDIO DEL GENE NEF IN LONG TERM NON-PROGRESSORS EMOFILICI

Andrea Crotti* (*Istituto Scientifico San Raffaele, Milano*); Tiziana Coradin (*); Francesca Neri (*); Davide Corti (*); Silvia Heltai (*); Andreas Baur (*University of Miami, School of Medicine, Dept. of Microbiology and Immunology, Miami, FL, USA*); Elena Sant'Agostino (*Centro "Anna Bianchi Bonomi", Università degli Studi di Milano*); Elisa Vicenzi (*)

Background: L'infezione con ceppi di HIV che variano nel gene nef può contribuire ad un'evoluzione ritardata della malattia. Abbiamo studiato, quindi, le funzioni del gene nef in un gruppo di 6 emofilici infettati con HIV prima del 1985 e che nel 1994 non avevano sviluppato AIDS e ricevuto terapia antiretrovirale. Ad oggi, 2 su 6 individui mantengono le caratteristiche di LTNP.

Metodi: Le sequenze di nef sono state ottenute mediante PCR sia da PBMC che dal plasma dei 6 pazienti in due prelievi distinti eseguiti rispettivamente nel 1994 e 1998. Circa 150 cloni sono stati sequenziati e 1 allele maggioritario per ogni paziente, è stato clonato nel clone molecolare infettivo NL4-3. L'infettività virale e la modulazione della membrana di CD4 sono state valutate in cellule CEM esprimenti *green fluorescence protein* (GFP) sotto il controllo di HIV LTR. La capacità replicativa dei diversi virus è stata determinata in blasti T cellulari stimolati con PHA ed IL-2.

Risultati: Due alleli di Nef su 6 riducevano significativamente l'infettività e la replicazione di HIV a livelli comparabili a quelli di un virus deleto in Nef. Uno dei 2 alleli difettivi era caratterizzato da una delezione di 5 aa nel dominio strutturale che contiene il motivo di-leucinic ritenuto responsabile della modulazione del CD4. Tuttavia, quando la singola mutazione è stata introdotta nel clone molecolare infettivo NL4-3 non risultava capace di modificare per se nè l'infettività nè la downregolazione del CD4. Anche il secondo allele non modulava il CD4 dalla membrana. È interessante sottolineare che questi due alleli difettivi sono stati ottenuti dalle 2 persone su 6 che mantengono spontaneamente lo stato di LTNP dopo oltre 20 anni d'infezione.

Conclusioni: Alterazioni funzionali del gene nef sono presenti in individui che sono rimasti LTNP per almeno vent'anni in assenza di terapia antiretrovirale. La discrepanza osservata tra la capacità dell'allele intero di ridurre l'infettività e la capacità replicativa del virus rispetto all'introduzione della singola mutazione suggerisce che questa possa divenire funzionale (ovvero inibire la replicazione di HIV) nel contesto molecolare del proprio allele.

Contributo: 40F.81

LISI MEDIATA DA COMPLEMENTO IN CELLULE INFETTATE DA HIV MEDIANTE INTERFERENZA CON L'INTERAZIONE HIV/FATTORE H

Silvia Beltrami* (*Dip. di Scienze Precliniche, Università degli Studi di Milano*); Eugenio Cesana (*); Silvia Della Bella** (*Dip. di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Milano*); Antonio Riva (**); Stefania Nicola (**); Alberto Clivio (*); Maria Luisa Villa (**)

Background: L'interazione del Fattore H (FH) del complemento con le glicoproteine di HIV protegge le cellule infettate dalla lisi mediata da complemento. Abbiamo caratterizzato la regione del FH responsabile dell'interazione con HIV utilizzando peptici sintetici. Intendiamo verificare la possibilità che lisati di cellule infettate da HIV ottenuti utilizzando questo approccio siano in grado di indurre l'attivazione di cellule dendritiche umane *in vitro*, fornendo un collegamento funzionale con la risposta T virus-specifica mediante esposizione a fattori liberati da cellule infettate in necrosi.

Metodi: 1) Produzione di lisati cellulari indotti da complemento in cellule cronicamente infettate da HIV. Sono state utilizzate cellule della linea 8E5, cronicamente infettate da HIV e cellule MOLT3 non infettate come controllo negativo. Sieri umani scomplementati mediante trattamento a 56° sono stati usati come fonte di anticorpi anti-HIV, necessari per attivare la via classica del complemento. Un pool di sieri umani freschi provenienti da soggetti sieronegativi per HIV è stato utilizzato come fonte di complemento. La lisi cellulare è stata valutata in citofluorimetria mediante incorporazione di Ioduro di Propidio.

2) Generazione e coltura di cellule dendritiche (DC): cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) sono state ottenute da buffy-coats di donatori sani mediante centrifugazione in Ficoll-Paque. I monociti sono stati arricchiti mediante aderenza su plastica e coltivati in presenza di GM-CSF e IL-4 o IFN- α rispettivamente per 5 e 3 giorni. Il differenziamento dei monociti in DC è stato verificato in base all'acquisizione di morfologia dendritica e alla negativizzazione di CD14.

Risultati: 1) È stato identificato un peptide sintetico in grado di inibire il legame del FH alle cellule infettate ed alle glicoproteine dell'involucro di HIV. Cellule cronicamente infettate da HIV esposte ad anticorpi provenienti da pazienti sieropositivi e a complemento umano non vengono lisate se non si inibisce il legame del FH. La lisi è dipendente dall'espressione di gp120/gp41 sulle cellule: cellule non infettate da HIV non vengono lisate in queste condizioni. Inoltre, la lisi è strettamente dipendente dalla presenza di anticorpi umani anti-HIV capaci di fissare il complemento: i controlli costituiti da cellule infettate senza aggiunta di Ig da pazienti AIDS non determinano lisi mediata da complemento. 2) Valutazione del fenotipo delle DC: al termine dell'incubazione le DC sono state analizzate in citofluorimetria per l'espressione di marcatori di lineage (CD14, CD1a), molecole HLA di classe I e II, molecole costimolatorie (CD80, CD86, CD40), marcatori di maturazione (CD83), altre molecole implicate nell'internalizzazione di antigeni virali (CD91, CD206). la produzione di citochine da parte delle DC, in condizioni basali o dopo stimolo, è stata valutata mediante metodi immunoenzimatici (ELISA ed ELISpot) e citofluorimetrici.

Conclusioni: Abbiamo messo a punto le condizioni ottimali per l'induzione della lisi mediata da complemento e per la coltivazione di cellule dendritiche umane. Abbiamo anche identificato un potenziale strumento per l'eliminazione delle cellule serbatoio di infezione.

Contributo: 40F.82

LA PROTEINA NEF DI HIV-1 MANIPOLANDO LE CELLULE DENDRITICHE INDUCE ANERGIA ED APOPTOSI DEI LINFOCITI T CD8+: UN MECCANISMO DI IMMUNO EVASIONE

Maria Giovanna Quaranta* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Benedetta Mattioli (*); Luciana Giordani (*); Marina Viora (*)

Background: La proteina Nef di HIV-1 è un determinante critico nella patogenesi dell'AIDS. Nef attraverso una combinazione di differenti effetti, sostiene la replicazione virale e promuove l'evasione del virus dalla risposta immunitaria. Sebbene nelle prime fasi dell'infezione gli individui HIV-1+ sviluppino risposte contro il virus, il sistema immunitario non è in grado di eliminare l'infezione. Infatti, l'HIV-1 ha sviluppato diversi meccanismi per evadere la risposta immune. Inoltre, la disfunzione delle cellule dendritiche (DC) può contribuire alla soppressione della risposta immunitaria associata alla progressione dell'AIDS. Recentemente abbiamo dimostrato che Nef attiva le DC immature (iDC) manipolandone il programma di differenziamento fenotipico, morfologico e funzionale inducendo così l'attivazione dei T CD4+. Questi risultati suggeriscono che Nef, potrebbe favorire sia la replicazione che la disseminazione virale. Poiché i T CD8+ svolgono un ruolo centrale nella immuno-sorveglianza, e poiché a tutt'oggi, non sono stati del tutto chiariti i meccanismi utilizzati dal virus per evadere la risposta immune, abbiamo determinato l'interferenza di Nef nel priming dei linfociti T CD8+.

Metodi: La proteina Nef ricombinante (HIV-1, ceppo ELI) è stata usata ad una concentrazione di 0.1 microgrammi/ml. Le DC sono state ottenute da monociti del sangue periferico coltivati con GM-CSF e IL-4. Nef o LPS sono stati aggiunti alle colture di iDC per 24 ore. È stata allestita una coltura allogenica tra DC irradiate e CD8+ e la risposta proliferativa è stata valutata mediante incorporazione di [3H]timidina. L'attività citotossica dei CD8+ co-cultivati con DC è stata valutata mediante test di rilascio del cromo. L'analisi dell'HLA-ABC, di FasL, IFN-gamma intracitoplasmatico e dei livelli di apoptosi è stata effettuata mediante citofluorimetria. L'attivazione delle caspasi 8 e 9 è stata valutata mediante kits commerciali. La concentrazione di TNF-alfa è stata misurata mediante ELISA ed i livelli di mRNA sono stati valutati mediante RT-PCR.

Risultati: Abbiamo dimostrato che Nef inibisce l'espressione delle molecole HLA-ABC sulla superficie delle iDC. Poiché il priming dei linfociti T CD8+ richiede il riconoscimento del TCR con il complesso peptide-MHC-I presente sulle DC, abbiamo valutato se Nef fosse in grado di influenzare la capacità delle DC di stimolare la proliferazione dei T CD8+. Abbiamo osservato che Nef inibisce la capacità stimolatoria delle DC verso T CD8+ allogenici. Poiché i T CD8+ hanno un ruolo critico nella difesa contro il virus grazie all'attività citotossica e la secrezione di fattori solubili, abbiamo valutato la competenza funzionale dei T CD8+ attivati da DC trattate con Nef. Abbiamo osservato che Nef è in grado di inibire l'induzione di CTL e la produzione di IFN-gamma da parte dei T CD8+. Inoltre, abbiamo dimostrato che Nef up-regola l'espressione e la produzione di TNF-alfa e Fas-L nelle iDC. Questo, determina l'induzione di apoptosi recettore-mediata dei T CD8+ correlata all'attivazione della caspasi 8.

Conclusioni: I nostri risultati indicano che Nef sovvertendo la biologia delle DC, induce l'anergia dei linfociti T CD8+ e questo potrebbe rappresentare un meccanismo dell'HIV-1 per evadere la risposta immune dell'ospite. Riguardo alla rilevanza *in vivo* i nostri risultati indicano che Nef contribuisce direttamente alla patogenesi dell'AIDS. Inoltre, i risultati ottenuti nei nostri studi *in vitro*, possono contribuire a capire le funzioni, il meccanismo di azione ed i partner cellulari e molecolari di Nef, al fine di sviluppare strategie terapeutiche.

Contributo: 40F/P

RUOLO DELLA PROTEINA P17 DI HIV NELLA DEREGOLAZIONE DEL COMPARTIMENTO LINFOCITARIO B

Rita Zamarchi* (*Università degli Studi di Padova*); Simona Fiorentini** (*Università degli Studi di Brescia*); Stefano Indraccolo (*Ist. di Genova/DSOCH - Università degli Studi di Padova*); Valeria Tosello (*); Erich Piovan (*); Alberto Amadori (*)

Background: L'infezione da HIV è accompagnata da un'intensa attivazione per lo più HIV specifica del compartimento B, la cui regolazione non è ancora completamente chiarita. Scopo principale dello studio è valutare l'attività sui linfociti B della proteina della matrice di HIV p17, una delle proteine regolatorie di HIV, capaci di utilizzare il sistema immunitario dell'ospite per promuovere l'infezione e la replicazione virale attraverso complesse relazioni col network citochinico.

Metodi: Produzione di p17 - La proteina p17 è stata prodotta e purificata secondo un protocollo standardizzato in lotti omogenei utili a coprire tutta la sperimentazione. La proteina è stata utilizzata come tale *in vitro* o biotinilata. Espressione del recettore di p17 (p17REC) sui linfociti B - La presenza di un recettore per la p17 sulla membrana dei linfociti B derivati da sangue periferico e in linee cellulari B stabilizzate *in vitro* con EBV (B-Lcl) è stata documentata mediante citofluorimetria, utilizzando p17 biotinilata evidenziata con streptavidina-PC5. Per quanto riguarda i linfociti B primari l'analisi è stata eseguita sia *ex vivo* che dopo stimolo *in vitro* con PWM, ed è stata condotta in doppia fluorescenza con anticorpi anti-CD20 PE. Valutazione dell'attività biologica di p17 nei linfociti B - Lo studio funzionale è stato condotto allestendo colture a breve termine (test IVAP) per la produzione *in vitro* di Ig. I test sono stati eseguiti a partire da PBMC di donatori sani coltivati come tali o depletati mediante immunomagnetismo dei linfociti T, in presenza o meno di dosi crescenti di p17 esogena.

Risultati: L'analisi citofluorimetrica evidenziava che circa un terzo dei linfociti B circolanti è p17REC+, anche se emergeva un'ampia variabilità individuale (media 32% \pm 24,3, mediana 23,3%). Dopo separazione dei PBMC la quota di linfociti B p17REC+ aumentava significativamente (media 68,7% \pm 17,7; mediana 68,6 %) e tale valore rimaneva sostanzialmente costante anche in colture a breve termine, soprattutto in presenza di PWM. Al contrario, le B-Lcl risultavano p17REC-, diversamente da una linea di linfoma di Burkitt EBV- che risultava p17REC+. Anche in questo caso l'espressione del recettore era molto variabile (range: 5-87%); studi sono in corso per determinare i fattori che condizionano l'espressione di p17REC in questa linea. I test IVAP allestiti da adulti HIV-dimostravano un aumento significativo della sintesi *in vitro* di Ig in presenza di p17 esogena, rispetto alle colture di controllo, sia in presenza (3522 vs 2006 ng/ml/100.000 linfociti B; $p < 0.003$) che in assenza (340 vs 70 ng/ml/100.000 linfociti B; $p = 0.037$) dello stimolo mitogenico. Tale incremento era dose dipendente, discretamente variabile da soggetto a soggetto e nel caso della produzione spontanea significativamente superiore ai valori di riferimento misurati negli adulti sani (range: 25-170 ng/ml/100.000 linfociti B). Dati preliminari sembrano indicare che la deplezione dei linfociti T non modifichi la promozione della sintesi di Ig da parte di p17.

Conclusioni: I risultati ottenuti indicano che circa un terzo dei linfociti B circolanti esprime costitutivamente il recettore per la p17 di HIV, la quale è in grado di attivare il compartimento B con un meccanismo verosimilmente T-indipendente. Studi ulteriori estesi ad altri distretti del sistema immunitario saranno necessari per chiarire quali meccanismi regolano l'attività biologica di p17 sui linfociti B.

Contributo: 40F.83

L'OLIGOMERO B DELLA TOSSINA PERTUSSICA (PTX-B) ED IL SUO MUTANTE NON TOSSICO PT9K/129G INIBISCONO LA PRODUZIONE DI TGFbeta INDOTTA DA HIV-1 TAT NELLE CELLULE NK E L'APOPTOSI TGFbeta-MEDIATA

Maria Raffaella Zocchi (*IRCCS San Raffaele, Milano*); Paola Contini (*DIMI, Università degli Studi di Genova*); Massimo Alfano (*DIID, IRCCS San Raffaele, Milano*); Alessandro Poggi (*Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro*)

Background: In corso di infezione da HIV-1 vengono prodotte numerose citochine: tra queste il transforming growth factor (TGF) beta che ha noti effetti immunosoppressivi, tra cui l'inibizione dell'attività citotossica delle cellule natural killer (NK). La trascrizione di TGFbeta può essere indotta dalla proteina virale Tat, attraverso l'attivazione di AP-1. Inoltre, TGFbeta ha effetti pro-apoptotici, dovuti alla defosforilazione di Akt, ed alla riduzione della sintesi di proteine antiapoptotiche. Al contrario una attivazione della fosfoinositol-3-cinasi (PI-3K) mantiene la fosforilazione di Akt e inibisce gli effetti di TGF-beta. Sia l'oligomero B della tossina pertussica (PTX-B) che il suo mutante non tossico PT9K/129G, componente del vaccino anti-pertosse, attivano PI-3K. Abbiamo quindi indagato se essi siano in grado di prevenire gli effetti di TGFbeta e di Tat sulle cellule NK.

Metodi: La trascrizione e secrezione di TGFbeta da parte di cellule NK sono state valutate mediante PCR semiquantitativa ed ELISA dopo esposizione a Tat esogeno per tempi sufficienti a consentirne l'internalizzazione e traslocazione nucleare. Si sono anche valutate la trascrizione di Bcl-2, Bcl-x e Bcl-xL e l'attivazione di Akt e di AP-1 in NK non trattate e trattate con Tat e con PTX-B o PT9K/129G. Infine, si sono analizzati i trascritti di Bcl-2, Bcl-x e Bcl-xL in NK di 20 pazienti affetti da infezione da HIV-1 (stadio A) e 10 donatori sani e si sono valutati l'RNA virale e, mediante ELISA, TGFbeta e Tat serici.

Risultati: PTX-B e PT9K/129G inibiscono la trascrizione e la secrezione di TGFbeta indotta da Tat nelle cellule NK. Inoltre, Tat attiva AP-1, in particolare cJun, mentre TGFbeta stimola cFos e cJun. Il trattamento delle NK con PTX-B o PT9K/129G inibisce l'attivazione di AP-1 sia da TGFbeta che da Tat. TGFbeta potenzia l'apoptosi delle cellule NK da carenza di fattori di crescita, riducendo la trascrizione di Bcl-2 e Bcl-x e inibendo la fosforilazione di Akt indotta via NKG2D. Questi effetti si prevencono esponendo le NK a PTX-B o a PT9K/129G, che attivano la PI-3K, responsabile delle fosforilazione di Akt. Infine, PTX-B e PT9K/129G stimolano la trascrizione di Bcl-xL, l'isoforma di Bcl-x che protegge le cellule dall'apoptosi da carenza di fattori di crescita. È interessante notare che nelle cellule NK di 12 pazienti HIV-1 l'espressione di mRNA per Bcl-2 and Bcl-xL era significativamente inferiore rispetto alle NK dei donatori sani. Negli stessi pazienti il numero di cellule circolanti CD3-CD16+ era inferiore al 10% (v.n. 10-18%), i livelli serici di TGFbeta variavano tra 50 e 100ng/ml (v.n.<10ng/ml), Tat era dosabile nel siero (20-40nM) e l'RNA virale era rilevabile tra le 900 e le 24.000 copie/ml. In 7/9 pazienti con <80 copie di RNA virale, i livelli serici di TGFbeta<30ng/ml, Tat non rilevabile e il numero di cellule CD3-CD16+ >10% e l'espressione di mRNA per Bcl-2 and Bcl-xL nelle cellule NK era paragonabile a quella dei soggetti sani.

Conclusioni: Questi risultati suggeriscono che la produzione di TGFbeta possa essere potenziata da Tat già nelle prime fasi della infezione virale e che ciò possa contribuire alla deplezione delle cellule NK con conseguente riduzione delle immunità innata. Considerando l'effetto ottenuto *in vitro* con il mutante non tossico di PTX-B, PT9K/129G, suggeriamo il suo possibile impiego *in vivo* non solo come adiuvante, ma per il potenziale effetto protettivo sulla sopravvivenza delle cellule NK.

Contributo: 40F.84

Progetto
Ricerca clinica e terapia della malattie da HIV

Responsabili scientifici
Prof. Mauro MORONI e Dr. Stefano VELLA

PROGRAMMA NAZIONALE DI CONTROLLO DI QUALITÀ ESTERNO PER LA DETERMINAZIONE DEI LINFOCITI T CD4+ MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO IN PAZIENTI HIV+

Federico Martini* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Bianca Mollicone** (*Azienda Policlinico "Umberto I", Roma*); Enrico Girardi (*); Gianpiero D'Offizi (*); Fernando Aiuti (**)

Background: La valutazione del numero di linfociti T CD4+ circolanti è, insieme al dato della carica virale, di fondamentale importanza nel management del paziente HIV+; esso è infatti preso sia quale valore soglia per valutare l'introduzione della terapia antiretrovirale, che per operare la stadiazione del paziente secondo il sistema di classificazione del CDC. Il numero di linfociti T CD4+ circolanti è determinato di routine mediante citofluorimetria a flusso. Due differenti protocolli analitici sono attualmente disponibili: quello in cui il numero assoluto delle cellule non è determinato direttamente dall'apparecchio, ma è derivato dall'emocromo ("doppia piattaforma", DPT), e quello in cui le conte assolute sono generate direttamente dal citofluorimetro ("singola piattaforma", SPT). Scopo del presente progetto è di offrire un programma di Controllo di Qualità esterno per la determinazione dei linfociti CD4+ mediante citofluorimetria, da offrire a tutti i maggiori Centri Diagnostici italiani che si occupano di pazienti HIV. L'analisi dei risultati permetterà il confronto di DPT e SPT in termini di precisione ed accuratezza.

Metodi: A tutti i Centri partecipanti saranno inviati campioni di sangue stabilizzato, che saranno processati allo stesso modo dei campioni dei pazienti. I risultati così ottenuti saranno inviati ad un Centro di Elaborazione centralizzato.

Risultati: 1. Si è identificato il tipo di reattivo stabilizzato da inviare ai Centri partecipanti.

2. È stata effettuata la valutazione preliminare del reattivo mediante esperimenti pilota su due tipi differenti di citofluorimetro (Beckman-Coulter e Becton-Dickinson), verificando il perfetto allineamento dei risultati ottenuti con quelli dichiarati dal fabbricante.

3. È stata stilata la lista dei 27 più importanti Centri Diagnostici italiani che si occupano di pazienti HIV che, contattati preliminarmente, si sono detti d'accordo a partecipare alla prima fase dello studio.

4. È in corso la definizione delle procedure di invio dei reattivi ai singoli Centri partecipanti, nonché della procedura telematica di ritorno dei risultati all'INMI L. Spallanzani, che si occuperà dell'elaborazione statistica.

Conclusioni: Il progetto è nelle fasi iniziali di attivazione. I primi risultati preliminari saranno disponibili entro la prossima estate.

Contributo: 30F.1

ANDAMENTO DEI LIVELLI DI HIV-DNA IN CORSO DI HAART

Massimo Andreoni* (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Loredana Sarmati (*); Lucia Palmisano** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Claudio Angeletti*** (*IRCCS L. Spallanzani, Roma*); Antonio Chiesi (**); Emanuele Nicastrì (**); Andrea Geraci (**); Stefano Vella (**); (IATC)

Background: In soggetti in trattamento antiretrovirale il livello di HIV-DNA nei PBMCs è associato alla progressione di malattia. Questo parametro può essere quindi importante per valutare l'opportunità di strategie di semplificazione o interruzione della terapia in pazienti con risposta viro-immunologica ad HAART. La ricerca ha valutato i livelli di HIV-DNA e altri parametri viro-immunologici in soggetti rispondenti ad HAART.

Metodi: È stato condotto uno studio longitudinale in 163 pazienti arruolati consecutivamente, in HAART da almeno 8 mesi, con viremia plasmatica stabilmente sotto le 50 copie di HIV-RNA/ml, senza aver avuto mai fallimenti terapeutici, blips viremici o interruzioni del trattamento. HIV-DNA nei PBMC è stato valutato con PCR mediante il protocollo Real Time TaqMan adattato al LightCycler. Il limite di rilevazione della metodica è di 20 HIV-DNA cp/106 PBMC.

Risultati: Dopo una mediana di 25 mesi di HAART (range 8 – 93 mesi) il valore medio di HIV-DNA era di 701 copie/106 PBMCs (mediana 360 cp, range <20-11,444). I pazienti con valori di HIV-DNA sotto il 25° percentile (133 cp/106 PBMC) erano più frequentemente omosessuali ($p=0.008$), avevano all'inizio di HAART e al momento dell'arruolamento valori assoluti e percentuali di CD4 più alti ($p<0.005$) e un periodo di trattamento più lungo ($p=0.001$) rispetto agli altri pazienti. All'analisi multivariata solo la durata del trattamento era significativamente correlata ai valori di HIV-DNA (OR 0.48, 95% CI 0.28-0.81, $p=0.006$). I 15 pazienti con livelli non rilevabili di HIV-DNA (<20 cp/106 PBMC) erano più frequentemente in terapia con PI ($p=0.06$) e significativamente meno trattati con NNRTI ($p=0.023$) rispetto ai pazienti con livelli di HIV-DNA rilevabili. Anche per questi pazienti, all'analisi multivariata solo la durata della terapia era significativamente più lunga rispetto agli altri pazienti (OR 0.16, 95% CI 0.06-0.43, $p=0.000$).

Conclusioni: I pazienti rispondenti ad HAART con livelli persistentemente non rilevabili di HIV-RNA hanno livelli estremamente variabili di HIV-DNA provirale. I più bassi livelli di HIV-DNA sono correlati ad una più lunga durata della terapia.

Contributo: 30F.2

IL FALLIMENTO VIROLOGICO ALLA HAART: VALORE PREDITTIVO DELL'ADERENZA AUTORIPORTATA E DEI LIVELLI PLASMATICI DEGLI ANTIRETROVIRALI ANALISI DELLA COORTE ADICONA

Maria Paola Trotta* (*IRCCS L. Spallanzani, Roma*); Stefano Bonora** (*Università degli Studi di Torino*); Adriana Ammassari*** (*Università Cattolica Sacro Cuore, Roma*); Alessandro Cozzi Lepri (*Royal Free Hospital, London, UK*); Patrizia Marconi (*) ; Rita Murri (***) ; Nicoletta Ladisa (*Policlinico Universitario di Bari*); Paola Nasta (*Università degli Studi di Brescia*); Laura Sighinolfi (*Arcispedale S. Anna, Ferrara*); Mauro Zaccarelli (*) ; Alessandra Riva (*Università degli Studi di Ancona*); Giordano Madeddu (*Università degli Studi di Sassari*); Patrizio De Longis (*) ; Antonella D'Arminio Monforte (*Ospedale L. Sacco, Milano*); Giovanni Di Perri (**); Andrea Antinori (*)

Background: Sia l'aderenza (ADH) alla terapia, sia le concentrazioni plasmatiche degli antiretrovirali sono stati associati al successo della terapia, tuttavia non è stato ancora chiarito il loro ruolo indipendente e complementare, né se esso vari per le singole classi di farmaci.

Metodi: Lo studio AdICoNA valuta l'ADH alla terapia HAART nella corte ICoNA. L' ADH è indagata mediante questionario autocompilato (calcolata come la percentuale delle compresse assunte su quelle prescritte negli ultimi tre giorni); contemporaneamente è effettuata la determinazione dei livelli plasmatici di antiretrovirali mediante SPE-HPLC. È stato stabilito uno score (PKS) che, per gli NNRTI e PI varia da 0 a 3 (PKS=0: concentrazioni non rilevabili, PKS=1: inferiori alla MEC, PKS=2: ottimali; PKS=3: superiori al livello ottimale atteso); per gli NRTI varia da 0 (concentrazioni non rilevabili) a 1 (concentrazioni rilevabili). In questa analisi sono inclusi tutti i soggetti (pz) con viremia non rilevabile (<80 cps/ml) al momento della rilevazione dell'aderenza, ed è stato successivamente calcolato il rischio di rebound viremico (VR: prima rilevazione di HIV-RNA >400 cps/ml dal baseline) mediante il modello multivariato di Poisson.

Risultati: Tra i 217 pz arruolati, 142 sono inclusi nella presente analisi: l' ADH era pari a 100% nel 87.4%, tra il 90-99% nel 7.1% e <90% nel 5.5%, mentre il 92.3% dei pz aveva almeno una classe di farmaci con PKS>1. L'incidenza (per 100 pzs) di VR è risultata pari a 11.1 (95%CI:6.5-17.9) nei pz con ADH del 100% e a 54.5 (95%CI: 20-118.7) in pz con aderenza tra 90-99%. Considerando i livelli plasmatici dei farmaci, i pz che non avevano nessuna classe con PKS>1 avevano un'incidenza di 73.3 (95%CI:36.6-131.2), rispetto a 11 (95%CI:4-23.7) e 7.8 (95%CI:3.5-14.7) nei pz con 1 o 2 classi di farmaci con PKS>1. Nel modello multivariato di Poisson gli unici predittori indipendenti di VR erano: il riportare un' ADH tra il 90-99% (RR 8.09; 95%CI: 2.29-28.5, rispetto ai pz con ADH del 100%) ed il numero di classi con PKS>1 (0.34; 0.16-0.72, per ogni classe in più). Analizzando l'impatto delle differenti classi di farmaci, è stata rilevata una tendenza (P=0.49 al test dell'interazione) per un maggior rischio di VR a livelli di ADH tra 90-99% nei pz trattati con PI (7.14; 1.92-26.6) rispetto agli NNRTI (2.75; 0.33-22.9); mentre solo il PKS relativo agli NRTI era associato significativamente al VR (0.33; 0.11-0.97 per PKS>1 rispetto a PKS=0).

Conclusioni: Sia la non-aderenza auto-riportata che l'aver livelli sotto-ottimali di farmaci antiretrovirali predicono in maniera indipendente il futuro fallimento della terapia in soggetti con viremia non rilevabile. Uno score farmacocinetico globale che comprenda tutte le classi di farmaci, inclusi gli NRTI, sembra avere un migliore valore predittivo rispetto alle singole classi considerate in maniera distinta.

Contributo: 30F.3

LA PRESENZA DI MULTIRESISTENZA SI ASSOCIA A RIDOTTA SOPRAVVIVENZA DOPO FALLIMENTO TERAPEUTICO IN UNA COORTE DI SOGGETTI CON INFEZIONE DA HIV

Mauro Zaccarelli* (*IRCCS L. Spallanzani, Roma*); Valerio Tozzi (*); Patrizia Lorenzini (*); Maria Paola Trotta (*); Federica Forbici (*); Ubaldo Visco Comandini (*); Caterina Gori (*); Roberta D'Arrigo (*); Pasquale Narciso (*); Carlo Federico Perno (*); Andrea Antinori (*)

Background: La presenza di multiresistenza di classe rappresenta uno dei punti nodali del management clinico della terapia antiretrovirale, tuttavia il suo ruolo come determinate di progressione clinica e di morte dopo terapia di salvataggio non è stato ancora ben definito.

Metodi: Studio di coorte prospettica tra i pazienti (pz) HIV-positivi che effettuano un test di resistenza genotipica (GRT) in seguito a fallimento virologico della terapia antiretrovirale presso l'Istituto "L. Spallanzani" in Roma, nel periodo 1999-2003. I dati comprendono: caratteristiche demografiche, storia infezione da HIV, storia terapeutica e parametri viro-immunologici. Il risultato dei GRT viene discusso collegialmente da clinici e virologi in modo da ottimizzare le terapie. Nella presente analisi i pz sono stati inclusi al primo GRT e sono stati seguiti per valutare, mediante stima di Kaplan-Meier, la probabilità di morte e/o nuovo evento AIDS. Il modello dei rischi proporzionali di Cox è stato utilizzato per calcolare i rischi di progressione clinica in rapporto alla presenza di differenti pattern di multi-resistenza. La presenza di multi-resistenza è stata definita secondo i criteri IAS per gli analoghi nucleosidici (MDR-NA), per gli analoghi non nucleosidici (MDR-NN) e per gli inibitori della proteasi (MDR-PI).

Risultati: 623 pz inclusi: al GRT la viremia plasmatica di HIV era pari a 4.39 log₁₀ cps/ml, mentre il valore dei CD4 era 302 cells/mm³; i pz erano stati trattati per un tempo mediano di 28 mesi (IQR 16-38) e il numero mediano di precedenti fallimenti era pari a 3 (IQR 1-4). Oltre la metà dei pz (50.9%) aveva almeno una MDR al GRT e 24 (3.9%) risultavano resistenti a tutte le 3 classi di antiretrovirali. Il tasso di incidenza di morte (per 100 persone-anno) era di 3.50 nei pz che non avevano evidenza di MDR, di 2.79 nei pz portatori di MDR per una classe, di 3.97 per la MDR a 2 classi e 11.90 per MDR a tutte le 3 classi di farmaci analizzate, con una probabilità stimata di morte, a 48 settimane, pari rispettivamente a 8.9%, 11.7%, 13.4%, e 27.1%. La probabilità di nuovo evento AIDS o morte è stato stimato pari, rispettivamente, a 16.0% (nessuna evidenza di MDR), 17.7% (MDR per 1 classe), 19.3% (MDR per 2 classi), e 35.9% (MDR per 3 classi). Analizzando in dettaglio il differente impatto della MDR per le specifiche classi di farmaci, le probabilità di progressione clinica erano: 18.1% (MDR-NA), 12.1% (MDR-NN), 9.7% (MDR-PI), 24.5% (doppia MDR-NA/NN), 21.4% (doppia MDR-PI/NN), e 11.3% (doppia MDR-NA/PI). In particolare, la singola MDR-NA (P=0.019 al log-rank test) e le doppie MDR-PI/NN (P=0.02 al log-rank test) e MDR-NA/NN (P=0.0003 al log-rank test) si associavano ad un aumento significativo del rischio di progressione clinica. L'aver avuto un precedente evento AIDS (AHR 2.68; 95%CI 1.19-6.05), l'ultima conta di linfociti CD4 (AHR: 0.74; 95%CI 0.65-0.86) e la presenza di MDR per 3 classi (AHR 3.43; 95%CI 1.12-10.78) erano significativamente associate ad un aumentato rischio di morte, mentre tale rischio risultava ridotto in associazione all'utilizzo di LPV/r nella terapia di salvataggio (AHR 0.37; 95%CI 0.15-0.91).

Conclusioni: Il rinvenimento di MDR per tutte le classi di farmaci o di specifiche coppie di multiresistenza di classe è un potente predittore di morte e progressione clinica della malattia da HIV.

Contributo: 30F.4

STUDIO DEI FATTORI CELLULARI COINVOLTI NELLA VARIABILITÀ DI RISPOSTA E NELLA RESISTENZA AGLI ANTIRETROVIRALI

O. Turriziani* (Università degli Studi di Roma "La Sapienza"); P. Pagnotti (*); A. Pierangeli (*); F. Bellomi (*); P. Di Marco (*); S. Parisi (Università degli Studi di Padova); V. Renda (*); A. Lazzarin (Università Vita-Salute, Milano); G. Antonelli (*)

Background: L'espressione di fattori cellulari che ostacolano il raggiungimento delle concentrazioni ottimali di farmaco all'interno della cellula bersaglio può essere considerata una delle cause della variabilità di risposta e della resistenza al trattamento. In questo ambito, era nostro intento: identificare i meccanismi responsabili di resistenza in una linea cellulare ottenuta dopo trattamento prolungato con 3 NA; verificare se esista una variabilità interindividuale dell'attività di alcuni enzimi cellulari, quali la timidina chinasi (TK) e la deossicitidina chinasi (dCK), coinvolti nel primo passo della fosforilazione di alcuni NA.

Metodi: La linea cellulare CEM, ottenuta dopo trattamento con ZDV, 3TC e ABC e denominata CEMZLA è stata caratterizzata mediante i seguenti saggi: attività antivirale, enzimatici, WB, real-time PCR. Lo studio sulla variabilità interindividuale dell'attività degli enzimi TK e dCK è stato eseguito su 46 campioni di PBMC provenienti da soggetti HIV + e "naive" al trattamento e su 26 campioni di PBMC provenienti da donatori sani (HD).

Risultati: Le CEMZLA presentano una rilevante resistenza alla attività antivirale della ZDV (30x), una modesta resistenza alla attività del 3TC (5x) e sono completamente sensibili all'attività dell'ABC. La ridotta sensibilità delle CEMZLA alla ZDV è dovuta ad una forte riduzione (60x) della attività della TK. Il difetto è associato ad una diminuita concentrazione della quantità di ZDV-TP (20x), ad una ridotta quantità di proteina TK, ma non ad una diminuita espressione del suo mRNA. Per quanto riguarda la modesta resistenza al 3TC, non è stata osservata alcuna alterazione dell'enzima dCK né una aumentata espressione dei seguenti trasportatori: MDR1, MRP1, MRP4, MRP5, ABCB11. Per quanto riguarda ABC, i dati dimostrano che questo composto non è in grado di selezionare cellule resistenti né usato singolarmente né in combinazione con altri farmaci. Per quanto riguarda lo studio *ex vivo*, i dati dimostrano che esiste una estesa variabilità interindividuale della attività della TK nel gruppo dei soggetti HIV+ (HIV+: CV= 87.2; HD: CV=36.6). Inoltre, nei soggetti HIV+, l'attività di questo enzima risulta essere significativamente maggiore rispetto alla attività enzimatica osservata nel gruppo di controllo [HIV+: attività della TK (media \pm SD)=0.39 \pm 0.34 U/mg; HD: attività della TK (media \pm SD)=0.21 \pm 0.077 U/mg; $p > 0.01$]. Anche per quanto riguarda i dati relativi alla attività della dCK, è stato possibile documentare una variabilità interindividuale solo nel gruppo di individui HIV+ (HIV+: CV =55.8; HD: CV=15.1). Tuttavia la attività della dCK nei soggetti infettati da HIV è minore rispetto alla attività enzimatica rilevata nel gruppo di controllo [HIV+: attività della dCK (media \pm -SD) = 2.90 \pm -1.62 U/mg; HD: attività della dCK (media \pm -SD) = 4.22 \pm -0.64U/mg; $p < 0.01$]. I livelli di attività della TK e della dCK non correlano con i valori di HIV-RNA plasmatico con il numero dei linfociti CD4+.

Conclusioni: Sebbene il significato clinico di queste osservazioni sia ancora oggetto di studio, i dati indicano che: fattori cellulari associati a farmacoresistenza possono essere selezionati anche dal trattamento combinato con diversi NA; la capacità di "indurre" resistenza cellulare non è condivisa in ugual misura da tutti gli NA; l'infezione da HIV influenza l'attività di enzimi che hanno un ruolo chiave nella attivazione di alcuni NA.

Contributo: 30F.5

LOPINAVIR/RITONAVIR PARAMETERS OF SISTEMIC EXPOSURE IN HIV-INFECTED CHILDREN FOLLOWING BID OR QD ADMINISTRATION

Raffaella Rosso* (*Clinica delle Malattie Infettive, Università degli Studi di Genova*); Antonio Di Biagio (*); Chiara Dentone (*); Antonio Ferrazin (*); Matteo Bassetti (*); Guido Castelli Gattinara (*Ospedale Bambin Gesù, Roma*); Alessandra Viganò (*Ospedale L. Sacco, Milano*); Carlo Giaquinto (*Università degli Studi di Padova*); Dante Bassetti (*)

Background: There is evidence that adherence to HAART predicts and is related to the virological and clinical response to therapy. Although not proven, it is likely that adherence and quality of life will be improved using once daily (QD) regimens in HIV-infected adults. Few studies have shown the efficacy and safety of a QD regimen in HIV infected-children and adolescents. Current guidelines recommend to treat HIV-infected children with the same principles of treatment used in adults and include lopinavir/ritonavir (LPV/r) in first-line antiretroviral regimens for naïve children. LPV/r has been developed as a twice-daily (BID) drug, however, it is under debate whether QD regimen may be used in naive adults patients. Pharmacokinetics and pharmacodynamic characteristics of LPV/r have not been properly defined in children. The study was designed to examine pharmacokinetics of QD vs BID of LPV in HIV-infected children.

Methods: This open-label prospective, comparative clinical trial was conducted at 3 large Italian Hospital. Subjects included in this study were children >2 and ≤14 years old with vertically acquired HIV-1 infection. There was no CD4+ cell count or plasma HIV-RNA levels restriction (table 1). All were naïve to protease inhibitors (PIs). Patients received LPV/r at dosage of 230/57.5 mg/m² BID or 460/115 mg/m² QD. LPV/r was associated to 2 NRTIs or 1 NRTI + 1 NNRTI on the basis of previous antiretroviral regimens and of drug resistance test (when available). In children receiving NNRTI, dosage of LPV/r was adjusted according to US DHHS: doses has been of 300/75mg/m² BID and 600/150 mg/m² QD. Sample collection and processing Blood samples (5-7 mL) were drawn in tubes containing EDTA before a morning dose of LPV/r (C min) and 1 h, 2 h e 4 h (C max) after administration of the morning dose; plasma was separated by centrifugation, and stored at -20°C. LPV through plasma levels were obtained after at least 4 week of treatment. Analytical methods LPV concentrations in plasma were determined by a high-pressure liquid chromatography assay (HPLC) developed and validated in Pharmacokinetic Lab. The HPLC analysis used a reverse-phase C18 analytical column and a mobile phase consisting of a gradient with 15-mM phosphate buffer (pH 5,75)-acetonitrile and UV monitoring. The analysis was via UV detection at 210 nm using a reversed-phase column.

Results: The variability of PK parameters was extremely high. Cmin resulted lower with the QD regimen with respect to the one observed with BID regimen (p<0.05, Mann-Whitney U test). Cmax were not significantly different. Analysis of the correlation between BMI and pharmacokinetics parameters did not reveal any significant correlation (BMI and Cmax, p=0.4043; BMI and Cmin p=0,3919).

Conclusions: QD of LPV/r dosing regimen can achieve similar Cmin and Cmax concentrations observed in the BID pediatric pharmacokinetics studies (Cmax 8.2 ± 2.9, Cmin 3.4 ± 2.1 µg/ml). Those concentrations may be sufficient to inhibit the replication of wild type virus in most of the children. Therefore, a clinical trial of QD LPV/r in children is warranted.

Grant: 30F.6

IMMUNOTERAPIA DELL'INFEZIONE DA HIV-1 BASATA SULL'USO DI CELLULE DENDRITICHE AUTOLOGHE GENERATE DA MONOCITI COLTIVATI IN PRESENZA DI IFN-ALFA

Caterina Lapenta* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Stefano Maria Santini (*); Massimo Spada (*); Simona Donati (*); Paola Rizza (*); Imerio Capone (*); Filippo Belardelli (*)

Background: Sebbene il progresso nel campo delle terapie antiretrovirali abbia ridotto la mortalità da infezione da HIV, ancora oggi il controllo immune della replicazione virale rimane una delle maggiori sfide della ricerca sull'AIDS. In anni recenti, l'uso di cellule dendritiche (DC) come adiuvanti cellulari per lo sviluppo di vaccini terapeutici contro il cancro e malattie infettive ha ricevuto una crescente attenzione. I risultati di uno studio clinico pilota hanno mostrato che la vaccinazione di pazienti HIV-infetti con DC autologhe caricate con il virus autologo inattivato è sicura e capace di indurre una marcata riduzione della carica virale ed una stabilità del numero di cellule T CD4+ (Nat. Med. 10:1359, 2004). In questo studio, sono state utilizzate DC generate da monociti mediante trattamento standard con IL-4 e GM-CSF.

Metodi: Recentemente il nostro gruppo ha descritto un nuovo protocollo per la generazione di DC altamente funzionali da monociti dopo coltura con GM-CSF/IFN-alfa (IFN-DC) (J. Exp. Med. 191:1777, 2000). Le IFN-DC caricate con HIV-1 inattivato con aldrithiol-2 (AT-2) sono in grado di indurre risposte immuni potenzialmente protettive contro il virus, sia *in vitro* che nel modello di topi hu-PBL-SCID. In particolare, le IFN-DC mostrano alti livelli di molecole costimolatorie e un fenotipo parzialmente maturo; le IFN-DC caricate con HIV-1 risultano altamente efficienti nell'induzione di anticorpi neutralizzanti anti-HIV e nella generazione di cellule T CD8+ virus specifiche nel modello hu-PBL-SCID. Utilizzando protocolli sperimentali recentemente descritti (J. Exp. Med. 198:361, 2003) abbiamo valutato *in vitro* e *in vivo* la capacità delle IFN-DCs di indurre risposte T CD8+ rispetto a DC ottenute da monociti coltivati con IL-4 e GM-CSF e indotti a maturazione con CD40-L.

Risultati: Durante quest'ultimo anno, abbiamo condotto una serie di esperimenti *in vitro* e nel modello "hu-PBL-SCID mouse", comparando l'efficacia di differenti tipi di DC "pulsate" con il virus HIV-1 inattivato (AT-2-HIV-1) nell'indurre una risposta immune umorale e cellulare primaria contro antigeni di HIV-1. In particolare, abbiamo potuto dimostrare che le IFN-DC sono superiori alle DC generate in presenza di IL-4 e GM-CSF e successivamente stimulate con CD40-L nell'indurre cross-priming di linfociti CD8+ contro antigeni esogeni di HIV-1 quando inoculate in topi "hu-PBL-SCID". Tale conclusione si è basata sulla valutazione mediante saggi ELISPOP per la rilevazione delle cellule produttrici IFN-gamma o il granzyme B, utilizzando cellule umane CD8+ recuperate dagli animali immunizzati. È importante sottolineare che le IFN-DC risultavano superiori nell'indurre il cross-priming delle cellule CD8+ contro antigeni di HIV anche in assenza di linfociti helper CD4+.

Conclusioni: I risultati evidenziano il vantaggio potenziale di usare le IFN-DC come adiuvanti cellulari per lo sviluppo di nuove strategie di vaccinazione terapeutica anti-HIV-1. Stiamo ora sviluppando le condizioni sperimentali adatte alla preparazione di IFN-DC per uso clinico. Queste cellule verranno "pulsate" con lipopeptidi di HIV-1 preparati in condizioni GMP da gruppo del Dr. J. G. Guillet (Parigi), i quali risultano essere idonei per il "caricamento" delle DC e per la loro presentazione nel contesto di MHC di classe I e classe II. Questa parte preclinica sarà funzionale alla preparazione della documentazione per l'avvio di uno studio clinico di fase I in pazienti HIV-infetti sottoposti a trattamento con HAART.

Contributo: 30F/A

EFFETTI DEL PURGING EX-VIVO DEL PURGING DEI MONOCITI CIRCOLANTI SULLA REINTRODUZIONE DELLA TERAPIA DOPO INTERRUZIONE PROGRAMMATA IN PAZIENTI MULTI DRUG RESISTENTI

Hamid Hasson* (*Ospedale San Raffaele, Milano*); Priscilla Biswas (*); Nicola Gianotti (*); Barbara Mantelli (*); Mauro Malnati (*); Andrea Vecchi (*); Silvia Nozza (*); Massimo Cernuschi (*); Mario Clerici (*Cattedra di Immunologia, Università degli Studi di Milano*); Adriano Lazzarin (*); Alberto Beretta (*)

Background: Nei pazienti con resistenze multiple ai farmaci antiretrovirali le interruzioni strutturate della terapia sono generalmente seguite dalla riemergenza dei virus suscettibili. Ciononostante, alla successiva reintroduzione della terapia le varianti resistenti riemergono dal serbatoio di cellule latentemente infette. I monociti circolanti sono stati dimostrati funzionare come serbatoi virali e possono essere rimossi mediante un sistema di purging selettivo da noi precedentemente sperimentato (MYP). In questo studio abbiamo voluto dimostrare gli effetti del MYP sulla risposta virologica ed immunologica alla reintroduzione della terapia

Metodi: Abbiamo randomizzato 12 pazienti con MDR per ricevere o no sei cicli consecutivi di MYP durante il periodo di sospensione terapeutica. Un regime HAART ottimizzato è stato reintrodotta alla ricomparsa di un genotipo virale sensibile o in caso di riduzione dei CD4 >40% rispetto alla baseline o comunque <200.

Risultati: Cinque dei sei pazienti che hanno eseguito il MYP non hanno dimostrato rebound virale durante un periodo medio di follow-up di 98 settimane. Al contrario, quattro dei sei pazienti di controllo hanno avuto un rebound virale dopo una media di 16 settimane dopo la reintroduzione della terapia. La differenza fra i due gruppi nel tempo al rebound virologico è risultata statisticamente significativa ($p=0,021$). Inoltre i due gruppi hanno dimostrato differenze significative nell'andamenti dei CD4 dopo la reintroduzione della terapia (+368 nel gruppo MYP e +135 nel gruppo di controllo). Non abbiamo osservato differenze significative fra i due gruppi nell'andamento dei CD4 durante il periodo di sospensione terapeutica.

Conclusioni: Il MYP, eseguito durante il periodo di sospensione terapeutica, migliora sensibilmente la risposta virologica ed immunologica alla reintroduzione della terapia. I risultati richiedono conferma su un numero più importante di pazienti. Il meccanismo di azione rimane da elucidare. Esso può essere legato sia ad una riduzione selettiva di cellule infette sia ad alterazioni nella omeostasi linfocitaria o monocitaria. Questa possibilità è suggerita dalla osservazione che in corso di MYP si modifica sensibilmente l'espressione di alcuni recettori di homing linfocitario e monocitario (Biswas *et al.* Clin. Immunol. 2003).

Contributo: 30F.7

USO DI NUOVE PROPRIETÀ DELL'RNA PER LA TERAPIA GENICA DI INFEZIONI DA HIV

Carlo Presutti* (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Michela Denti (*); Irene Bozzoni (*)

Background: Il virus dell'HIV è un ovvio bersaglio per la RNAi poiché risultano attaccabili i numerosi intermedi a RNA che si originano durante il suo ciclo replicativo. Potenziali bersagli per efficaci esperimenti di RNAi sono i geni virali indispensabili per la replicazione e le sequenze maggiormente conservate tra i vari ceppi virali. I geni della cellula ospite richiesti per l'ingresso del virione o indispensabili per il suo ciclo vitale possono anche essere bersagli purché non siano indispensabili alla sopravvivenza della cellula stessa. Ottimi possibili bersagli di esperimenti di RNAi potrebbero essere: a) Tat mRNA; dopo l'inserimento del provirus, si deve avere l'espressione della proteina Tat, codificata dal virus stesso, affinché si possa avviare una efficiente trascrizione del virus; quindi inibire l'espressione del gene Tat potrebbe essere un'ottima strategia sia direttamente sia indirettamente, cioè usata in congiunzione ad altri target virali che in assenza della proteina Tat sarebbero espressi in misura considerevolmente minore e quindi molto più facilmente silenziabili. Il processo di RNAi avviene ad alta efficienza nei linfociti CD4+ e nei macrofagi che sono le cellule naturalmente infettate dal virus dell'HIV, b) la replicazione del virus HIV potrebbe essere inibita anche interferendo con trascritti cellulari dai quali il virus dipende per la sua replicazione. Il recettore 5 della CC-chemokine (CCR5) è una proteina non essenziale che si pone come un ottimo candidato per una azione antivirale. Il silenziamento genico mediato da RNAi è strettamente sequenza-specifico. Sfortunatamente il genoma virale è un bersaglio che cambia continuamente: a causa della poca accuratezza della trascrittasi inversa virale, nuove varianti del virus vengono continuamente generate. Allo scopo di minimizzare il rischio che le sequenze dell' siRNA non riconoscano più il bersaglio a causa di una sopravvenuta mutazione pensiamo di effettuare RNAi su diversi bersagli virali e/o cellulari contemporaneamente. La maggior parte degli studi effettuati fino ad oggi hanno previsto l'uso di siRNA artificiali; tuttavia questa tecnologia è costosa e soprattutto non permette una duratura presenza di molecole interferenti nel tempo. Recentemente abbiamo sviluppato un nuovo vettore di espressione per siRNA (psiUx) basato sulla trascrizione della polimerasi II, il promotore usato è quello del piccolo snRNA umano U1 (Denti *et al.* Mol. Therapy 2004 10:191-199). Denti MA, Rosa A, Sthandier O, De Angelis FG, Bozzoni I. (2004) A new vector, based on the PolII promoter of the U1 snRNA gene, for the expression of siRNAs in mammalian cells. Mol Ther. 10:191-9.

Risultati: Lo scopo ultimo di questo progetto è la messa a punto di sistemi di inibizione dell'espressione del virus HIV attraverso l'uso di piccole molecole di RNA con azione silenziante (siRNA) o modificante (snoRNA-like). Nel corso di questi primi mesi è stato ultimato ed ottimizzato il vettore psiUx. Sono stati scelti i bersagli da silenziare e modificare per cercare di massimizzare l'effetto sulla replicazione ed espressione del genoma virale, i migliori candidati sono Tat, Rev, CCR5, 5'LTR HIV e sono stati progettati i costrutti per la produzione di siRNA contro i bersagli identificati: in particolare è stata effettuata la scelta delle sequenze e l'analisi bioinformatica di eventuali omologie. È stata altresì iniziata la costruzione di costrutti di "controllo": siRNA mutati e "scrambled". Nel vettore psiUx verranno clonati contemporaneamente sia una regione codificante una molecola con attività di interference (siRNA) che una con attività di modificazione (snoRNA-like).

Contributo: 30F.8

TOSSICITÀ CARDIOVASCOLARE IN PAZIENTI HIV POSITIVI IN HAART

Antonietta Cargnel* (*Ospedale L. Sacco, Milano*); Massimo Pagani** (*Università degli Studi di Milano*); Luisa Cesaris (*); Mara Malacarne (**); Agostino Zambelli (*)

Background: Lo studio si propone di valutare il rischio cardiovascolare nei pazienti HIV positivi, legato all'assunzione cronica di TARV. Mentre le alterazioni metaboliche conseguenti alla TARV, sono già ampiamente studiate dal punto di vista patogenetico e terapeutico, ancora poco conosciuto è il rischio cardiovascolare, nonostante rappresenti un problema di grande attualità, per il miglioramento delle aspettative di vita nei soggetti HIV positivi e le crescenti segnalazioni di incidenti cardiovascolari. Dalla valutazione degli outcomes di questo studio, si prevede un apporto scientifico chiarificatore del rischio cardiovascolare nei soggetti HIV positivi e dell'evoluzione nel tempo, in rapporto all'infezione da HIV ed ai diversi regimi di TARV.

Metodi: Pazienti HIV-positivi, maschi, età 30-45 anni:

1. soggetti naive per TARV

2. soggetti in TARV con o senza PI da almeno sei mesi, senza lipodistrofia e/o alterazioni del metabolismo

3. soggetti in TARV con o senza PI da almeno sei mesi, con lipodistrofia e/o alterazioni del metabolismo. Nessuna diagnosi di ipertensione, diabete o patologie CV all'arruolamento. Gruppo controllo di soggetti HIV-negativi per la valutazione del sistema autonomo cardiaco. Accertamenti eseguiti al tempo 0 (T0) e ogni 6 mesi nel follow-up (T1, T2, ecc): - esami ematologici, immunovirologici, biochimici, ed endocrinologici; - studio antropometrico; - analisi bioimpedenziometrica; - registrazione ECG monocanale in clino- ed ortostatismo-Eco-doppler TSA-test da sforzo-Holter pressorio-ecocardiogramma (se indicato dalle condizioni cliniche); - valutazione delle alterazioni morfologiche e metaboliche mediante classificazione dell'ART-associated Lipodystrophy European Comparative. Study (ALECS) Group.

Risultati: 35 pazienti arruolati, età media 42 anni, 54% in TARV con PI e 43% senza PI, 3 % NAIVE, il 60% dei pazienti ha assunto PI nei precedenti trattamenti. 17 pazienti al T1 e 5 al T2. 32% dei pazienti classificati in stadio C, almeno un fattore di rischio per malattia CV presente nel 40% dei pazienti. Risultati al T0: Valore medio CD4+ 529/mm³ (range 149-1042, mediana 483/mm³), l'HIV-RNA medio (log₁₀) a 2,51 (range 1,69-5,3, mediana 1,69). BMI medio pari a 24,9; il 50% con valori superiori alla norma, CV/CF come da obesità addominale nel 76% dei casi, il 40% dei pazienti mostra segni evidenti di lipodistrofia. I valori di pressione arteriosa al di sopra della norma nel 40% dei casi. Il test ergometrico è risultato negativo per ridotta riserva coronarica in tutti i pazienti. 32% dei pazienti presentano spessore patologico (>1 mm) dell'intima dell'arteria carotide comune. 1 paziente presenta placca ateromastica fibrocalcifica. I dati ottenuti con la metodica transtelefonica di studio della variabilità della frequenza cardiaca sembrano suggerire che nei pazienti HIV+ è presente una marcata alterazione della modulazione neurovegetativa del nodo del seno, che appare ancora maggiore quando siano in atto TARV con inibitori delle proteasi.

Conclusioni: I pazienti valutati mostrano alterazioni vascolari a carico dell'intima carotidea, alterazioni del metabolismo lipidico e una marcata alterazione della modulazione neurovegetativa del nodo del seno, aumentate rispetto alla normale popolazione della stessa età. Inoltre, le alterazioni neurovegetative sono più marcate nei pazienti in trattamento con PI. Appare necessario un monitoraggio a più lungo termine dei pazienti ed un ampliamento del numero di pazienti valutati per confermare i dati acquisiti, che comunque propendono per una maggiore esposizione al rischio cardiovascolare nei pazienti HIV positivi.

Contributo: 30F.9

PROGRESS REPORT I° ANNO PROGETTO SIFIM

Antonella Castagna* (*IRCCS San Raffaele, Milano*); Andrea Antinori** (*IRCCS L. Spallanzani, Roma*); Massimo Clementi (*Università Vita-Salute, Milano*); Antonella D'Arminio Monforte (*Università degli Studi di Milano, Ospedale L. Sacco, Milano*); Giuliana Fusetti (*); Patrizia Lorenzini (**); Franco Maggiolo (*Ospedali Riuniti di Bergamo*); Cristina Mussini (*Policlinico di Modena*); Carlo Federico Perno (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Patrizio Pezzotti (*ASP, Regione Lazio*); Carlo Torti (*Spedali Civili di Brescia*)

Background: Questo progetto si propone di confrontare in pazienti con infezione da HIV-1, estesa resistenza alle tre classi di farmaci antiretrovirali, in fallimento virologico, con linfociti CD4 compresi tra 250–500 cellule/mm³, tre strategie di salvataggio differenti per valutare quale approccio sia più efficace nel prevenire il fallimento immunologico/clinico, end-point primario dello studio. Gli elementi innovativi rispetto ad altri studi clinici già condotti su questa popolazione sono: 1) indagare la potenziale efficacia “immunologica” a lungo termine (96 settimane) delle terapie antiretrovirali previste nello studio e basate sul riciclo di farmaci già utilizzati dai pazienti in precedenza; 2) criterio di modifica della terapia antiretrovirale impostato sul mantenimento di una pressione selettiva sulla variante virale di volta in volta prevalente; 3) interruzione terapeutica completa o di classe non considerata come una strategia alternativa alla terapia antiretrovirale, ma come fase “propedeutica” nell’ambito di un sequenziamento predefinito con l’intento di incrementare l’efficacia immunologica di farmaci già utilizzati dai pazienti.

Metodi: Studio di fase IIIb, multicentrico, nazionale, randomizzato, in aperto, della durata di 96 settimane, nel quale verranno inclusi 250 pazienti randomizzati in tre gruppi a ricevere in un rapporto 1:2:2: A) HAART impostata e modificabile sulla base del genotipo effettuato alla visita basale e poi ogni 12 settimane; B) interruzione terapeutica completa fino ad un massimo di 24 settimane o riscontro di CD4<200, seguita da HAART contenente un doppio inibitore delle proteasi (IP) potenziato con basse dosi di ritonavir per le restanti 72 settimane; C) interruzione terapeutica completa fino ad un massimo di 24 settimane o riscontro di CD4<200, seguita da HAART non contenente IP fino ad un massimo di 48 settimane, seguita da HAART contenente un singolo IP potenziato con basse dosi di ritonavir per le restanti 24 settimane.

Risultati: 1) Ottenimento dell’approvazione etica da parte del Centro Coordinatore, IRCCS San Raffaele, Milano, alla conduzione dello studio e conseguente inoltre agli altri Centri partecipanti della documentazione necessaria per ottenere le approvazioni dei rispettivi Comitati Etici (al momento 11 Centri attivi su 31 selezionati); 2) Costituzione dello Steering Committee del progetto; 3) Costituzione del “Data & Safety Monitoring Board” (DSMB) indipendente; 4) Creazione della scheda raccolta dati elettronica nel sito www.sifim.net e del data base per l’analisi statistica; 5) A settembre 2004 è iniziato l’arruolamento nei Centri attivi. Al momento sono stati “screenati” 14 pazienti, di cui 9 randomizzati e 5 non sono risultati includibili. Non sono stati segnalati Eventi Avversi Seri e/o raggiungimento dell’end-point primario dello studio nei pazienti arruolati fino ad ora; 6) stoccaggio nei Centri attivi del materiale biologico (plasma e cellule mononucleate del sangue periferico) per successivi sottostudi.

Conclusioni: Il progetto sta proseguendo secondo gli obiettivi previsti per il primo anno. Il ritardo nell’arruolamento è giustificato dal numero limitato di Centri per ora attivi, dalle caratteristiche restrittive dei criteri di inclusione e dal tasso di fallimento allo screening, caratteristica degli studi clinici condotti sui pazienti multiresistenti.

Contributo: 30F.10

MODULAZIONI DELLE FUNZIONI DI TRASPORTO DELLA P-GLICOPROTEINA ESERCITATA DA ANTICORPI MONOCLONALI SPECIFICI

Maurizio Cianfruglia* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Maria Luisa Dupuis (*); Marina Tombesi (*); Michela Flego (*); Silvia Zamboni (*); Alessandro Ascione (*); Patrizia Puddu (*); Stefano Barca (*)

Background: Per aumentare la biodisponibilità degli PIs, diminuendone concentrazione ed effetti avversi, sono in fase di sviluppo diversi modelli sperimentali che includono l'identificazione di modulatori della P-glicoproteina di origine chimica, oligonucleotidi antisense, fattori che regolano negativamente l'espressione del gene MDR1 ed anticorpi monoclonali specifici. In tal riguardo, la strategia che intendiamo sviluppare si pone come obiettivo:

- la selezione di Mabs capaci di modulare negativamente la P-glicoproteina;
- la costruzione di anticorpi chimerici uomo/topo e/o umani attraverso l'ingegnerizzazione delle immunoglobuline monoclonali e l'isolamento di scFvs da librerie fagiche anticorpali;
- l'identificazione di porzioni funzionali ristrette P-glicoproteina.

Metodi: a) Funzionalità degli anticorpi. Gli esperimenti di inibizione della P-glicoproteina sono stati condotti verificando se ed in che modo la presenza dei singoli anticorpi e/o miscele calibrate di questi interferisce/ro con il livello di ritenzione/rilascio di substrati da parte di cellule umane MDR. Inoltre, sono stati valutati gli effetti sinergici sul blocco della P-glicoproteina indotti da modulatori chimici della MDR, PIs (Saquinavir, Indinavir) e farmaci che vengono somministrati in corso di infezioni opportunistiche (Cloroquina, Ketoconazolo). In parallelo sono stati messe a punto e sono in fase di attivo sviluppo le procedure e metodi riguardanti.

- l'ingegnerizzazione delle immunoglobuline monoclonali.
- studi sulla struttura e funzione della P-glicoproteina.

Risultati: Funzionalità degli anticorpi Tutti gli anticorpi monoclonali presi in esame esercitano una qualche azione inibitoria nei confronti della P-glicoproteina anche se nella modulazione del sistema di efflusso intervengono diversi fattori che includono: i) l'epitopo riconosciuto (i.e. UIC2, MM13.4, MM12.10); ii) il farmaco substrato utilizzato; iii) caratteristiche sperimentali (i.e., pre-trattamento delle cellule MDR etc.). Nessuna correlazione sembra esservi fra affinità di legame e capacità inibitorie esercitate sulla P-glicoproteina da parte degli anticorpi. Miscele calibrate di MAb o la combinazione di singoli MAb con inibitori delle proteasi di HIV (Saquinavir), Ketoconazolo o Cloroquina possono dar luogo a fenomeni sinergici di inibizione. Ingegnerizzazione delle immunoglobuline monoclonali. I geni per le VH e VL di due fra i più promettenti anticorpi monoclonali ad attività inibitoria (MM12.10 ed UIC2) sono state isolate e caratterizzate a livello genico-molecolare ed inserite in appropriati vettori per l'espressione di Mab chimerici uomo/topo. Parallelamente scFvs umani derivati da una libreria fagica anticorpale sono stati isolati e caratterizzati per reattività verso frammenti extracellulari della P-glicoproteina. c) studi strutturali e funzionali della P-glicoproteina Mediante l'uso del phage display combinato con procedure di biopanning, sono stati selezionati mimotopi della P-glicoproteina; la successiva caratterizzazione genica e funzionale degli inserti ha messo in evidenza porzioni funzionali ristrette della proteina nel suo dominio extracellulare.

Conclusioni: I risultati ottenuti indicano che per indurre e/o attenuare le funzioni di trasporto della P-glicoproteina gli anticorpi monoclonali rappresentano una valida alternativa all'uso di composti chimici. Differentemente da questi si contraddistinguono per la loro specificità, per la loro persistente efficacia e la ridotta tossicità specialmente se sono stati sottoposti a procedure di "umanizzazione".

Contributo: 30F/B

EFFETTO PERSISTENTE DI HAART SULLA REPLICAZIONE DI HIV-1 A LIVELLO INTRATECALE NONOSTANTE FALLIMENTO TERAPEUTICO A LIVELLO SISTEMICO

Sara Calmieri* (*Ospedale San Raffaele, Milano*); Laura Galli (*); Rosa Pedale (*); Arabella Bestetti (*); Serena Sala (*); Stefania Sala (*); Adriano Lazzarin (*); Paola Cinque (*)

Background: In seguito a trattamento con HAART per lunghi periodi, una proporzione rilevante di pazienti mostra un fallimento virologico alla terapia. A causa della penetrazione limitata di alcuni farmaci nel tessuto cerebrale, è stata avanzata l'ipotesi che il fallimento virologico potesse avvenire più precocemente nel liquor che nel plasma. L'obiettivo dello studio è stato di valutare la presenza del fallimento virologico nel liquor rispetto al plasma in pazienti trattati con HAART a lungo termine.

Metodi: Il carico di HIV-1 RNA è stato misurato prospetticamente nel liquor e nel plasma di 267 pazienti con sintomi neurologici in cui il liquor era stato prelevato a scopo diagnostico nel periodo gennaio 1997-dicembre 2004 presso la Clinica di Malattie Infettive dell'Ospedale San Raffaele di Milano. Sono stati considerati solo pazienti che hanno ricevuto HAART o che non hanno ricevuto alcuna terapia in modo continuativo per almeno 6 mesi prima del prelievo di liquor. In 26 pazienti sono inoltre state sequenziate le regioni di RT e proteasi da liquor e/o da plasma. L'analisi univariata è stata eseguita mediante test chi quadrato per il confronto di variabili dicotomiche e il test di Wilcoxon per confrontare variabili continue. La regressione logistica multipla è stata utilizzata per confrontare il contributo indipendente dei potenziali fattori di rischio di fallimento virologico nel liquor.

Risultati: Sono stati inclusi nello studio 128/267 pazienti, 61 dei quali erano in trattamento con HAART e 67 dei quali non assumevano terapia antiretrovirale al momento del prelievo del liquor. Considerando un livello di cut-off di HIV-1 RNA nel plasma di 2.60 log c/mL, 24 pazienti sono stati classificati come HAART-responders (HAART-R) e 37 come HAART-failures (HAART-F). La durata media di HAART non era diversa tra HAART-R (mediana 642 giorni; IQR, 336-1247) e HAART-F (mediana, 510 giorni; IQR, 324-1107). I livelli di HIV-1 RNA nel liquor erano >2.60 log c/mL in 56/67 pazienti non trattati (84%), in 1/23 dei pazienti HAART-R (4%) e in 18/37 dei pazienti HAART-F (49%) (non trattati vs HAART-F, $p=0.001$). I livelli di HIV-1 RNA nel liquor erano più bassi nei pazienti HAART-F che nei non trattati (mediana: 2.60 vs 4.00 log c/mL, $p<0.0001$). Anche i livelli plasmatici di HIV-1 RNA erano più bassi e il numero di linfociti CD4 positivi erano più elevati nei pazienti HAART-F che nei non trattati (HIV-1 RNA nel plasma: mediana, 4.30 vs 5.36 log c/mL, $p<0.0001$) (CD4: mediana, 109 vs 50/ μ L, $p<0.0001$). In un modello di analisi multivariata comprendente solo pazienti con livelli di HIV-1 RNA nel plasma >2.60 log c/mL, il rischio di fallimento virologico nel liquor era più elevato nei pazienti non trattati che nei pazienti HAART-F (OR=1.86, 95%CI=1.12-3.17, $p=0.018$), mentre non era associato ad elevati livelli di HIV-1 RNA nel plasma né a basse conte di linfociti CD4. Mutazioni associate a farmacoresistenza nel liquor e/o nel plasma sono state evidenziate nella totalità dei pazienti HAART-F, ma solo in 6/16 (37%) pazienti non trattati.

Conclusioni: HAART sembra mantenere la sua efficacia sulla replicazione intratecale di HIV in pazienti trattati con HAART per lunghi periodi, indipendentemente dal fallimento viroimmunologico e della comparsa di farmacoresistenza sia a livello sistemico che locale.

Contributo: 30F.11

MODULAZIONE DELLA FITNESS DI HIV-1 IN CORSO DI TERAPIA ANTIRETROVIRALE

Filippo Canducci* (*Università Vita-Salute, Milano*); Martina Mammarella (*); Enzo Boeri (*); Roberto Burioni (*); Massimo Clementi (*)

Background: È stata condotta una valutazione della capacità replicativa di varianti di HIV-1 selezionate dal trattamento con farmaci appartenenti a diverse classi. Scopo dello studio è stato non solo quello di valutare le conseguenze sulla fitness virale delle mutazioni che conferiscono resistenza, ma anche quello, più generale, di analizzare l'eventuale ruolo diagnostico e clinico delle modificazioni della fitness relativa di HIV-1.

Metodi: Lo studio si è basato sulla generazione di originali vettori virali ricombinanti che consentono la replicazione virale dopo ricostruzione con la sequenza d'interesse e successiva trasfezione. Il virus ricombinante così ottenuto è stato valutato per le sue caratteristiche biologiche (inclusa la capacità replicativa) e i dati sono stati quindi analizzati alla luce delle modificazioni della sequenza virale. In alcuni casi l'approfondimento sequenza-funzione si è avvalso di studi di site-directed mutagenesis.

Risultati: 1) Sono state analizzate sequenze del gene pol in soggetti in varie fasi di trattamento e con diverso outcome virologico. Questi dati hanno consentito di valutare la dinamica della fitness delle varianti resistenti agli inibitori delle proteasi (PI) (Menzo *et al.*, AIDS, 2003). Sono state anche studiate le caratteristiche dell'evoluzione *in vivo* di tali varianti resistenti a PI (Boeri *et al.*, AR&HR, 2003; Giancotti *et al.*, AR&HR, 2005), in assenza di pressione selettiva.

2) È stata valutata la capacità replicativa delle varianti resistenti ad enfuvirtide, un inibitore della fusione di HIV-1 che si caratterizza per una bassa barriera genetica alla resistenza, e, in questi casi, è stato documentato un incostante e modesto decremento della fitness (Menzo *et al.*, AA&C, 2004). In questo studio sono state definite in particolare le basi molecolari della resistenza ad enfuvirtide.

3) È stata sviluppata una procedura per realizzare virus ricombinanti che consentano la valutazione sequenza-funzione di V3 in contesti gp120 sia CCR5-, che CXCR4-tropici. La metodologia ha consentito di studiare varianti virali selezionate sia in soggetti con diversa progressione dell'infezione (Bagnarelli *et al.*, Virology, 2003) sia in soggetti pediatrici, in fallimento virologico, ma con diverso decorso immunologico (Bagnarelli *et al.*, AR&HR, 2004).

4) È stato eseguito uno studio per valutare il ruolo della modificazione della fitness virale legato alla presenza della mutazione 184 (RT), mutazione selezionata nelle varianti resistenti a lamivudina, nell'indurre un beneficio clinico in soggetti in fallimento virologico (manoscritto in preparazione).

Conclusioni: Il progetto si è mosso con gli obiettivi di caratterizzare le modificazioni della fitness di HIV-1 indotte dalla selezione delle varianti resistenti in corso di terapia con farmaci appartenenti alle diverse classi di inibitori. Allo scopo sono state sviluppate procedure basate sull'uso di virus ricombinanti, utilizzando backbones virali e sequenze direttamente amplificate da campioni biologici. I risultati hanno fornito una valutazione ampia delle modificazioni della fitness virale relativa in varianti resistenti ai composti antiretrovirali. Infine, la ricerca si sta ponendo l'obiettivo di fare luce sul significato patogenetico-clinico della modulazione della fitness di HIV-1, uscendo da una logica meramente osservazionale.

Contributo: 30F.12

EFFETTO IMMUNOVIROLOGICO DI UN PROTOCOLLO DI VACCINAZIONE TERAPEUTICA CON HIV-1 *WHOLE KILLED VACCINE* IN PAZIENTI ASINTOMATICI E HAART-NAIVE

Daria Trabattoni* (*Università degli Studi di Milano*); Andrea Gori (*) (*Ospedale di Busto Arsizio*); Renato Maserati (*IRCCS San Matteo, Pavia*); Francesco Mazzotta (*Ospedale S.S. Annunziata, Antella*); Mario Clerici (*)

Background: Nell'infezione da HIV-1 è stato più volte considerato l'impiego di agenti capaci di stimolare la risposta immune innata al fine di ritardare l'assunzione della terapia antiretrovirale. L'immunogenicità di un vaccino gp120-depleto, ed inattivato risospeso nell'adiuvante incompleto di Freund (IFA)(REMUNE), è stata valutata in soggetti HIV-1 infetti mai sottoposti a terapia HAART (HAART-naive).

Metodi: Pazienti asintomatici HAART-naive con viral load pari a 10,000-40,000 copie/mL e CD4 compresi tra 400-800 cellule/ml sono state trattati iniettando tre dosi di Remune (n=19), IFA (n=11), o una soluzione salina (n=10) alle settimane 0, 12, e 24. Un quarto prelievo è stato effettuato 4 settimane dopo l'ultima somministrazione di Remune (settimana 28). Per valutare la durata dell'effetto immunomodulatorio, un quarto gruppo di pazienti ha ricevuto una singola dose di Remune. I dati qui presentati riguardano la comparazione di parametri immunologici alla baseline e dopo 28 settimane di immunoterapia.

Risultati: La mediana della conta assoluta dei CD4 è rimasta stabile alla settimana 28 nei pazienti trattati con tre dosi di Remune, ma si è ridotta nei pazienti trattati con IFA o soluzione salina. Analogamente, la conta di CD4 è diminuita alla settimana 28 nei pazienti che hanno ricevuto una singola dose di REMUNE. La somministrazione di tre dosi di Remune ha determinato un aumento della concentrazione sierica di IL-7 e di linfociti CD4 naive (CCR7+/RA+) e central memory (CCR7+/RA-) e una diminuzione di linfociti CD4 effector memory (CCR7-/RA-). Linfociti CD8 HIV-1-specifici IL-10-produttori (ICC) sono diminuiti a partire dalla settimana 28 nei pazienti Remune. Tali variazioni non sono state osservate in pazienti trattati con IFA o soluzione salina, o in pazienti che hanno ricevuto una sola dose di REMUNE.

Conclusioni: L'immunoterapia con Remune correla con cambiamenti fenotipici dei linfociti circolanti e con la riduzione di citochine di tipo 2. L'estensione di questi analisi a coorti più numerose sarà comunque necessaria per valutare correttamente la rilevanza clinica di questi risultati.

Contributo: 30F.13

NEF INDUCE DISREGOLAZIONE DEI PODOCITI, EVENTO CHIAVE DELLA NEFROPATIA HIV-ASSOCIATA (HIVAN), ATTRAVERSO LA SINTESI DI PAF

D. Atragene* (*Università degli Studi dell'Insubria, Varese*); A. Bottelli (*) ; E. Ferioli (*) ; M. Federico (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); G. Camussi (*Università degli Studi di Torino*); P. G. Conaldi (*)

Background: HIVAN interessa fino al 10% dei pazienti infettati da HIV ed è caratterizzata da grave proteinuria e rapida progressione verso l'end-stage renal disease (ESRD). La HAART ha dimostrato scarsa efficacia sulla progressione dell'HIVAN per cui si stima che i casi di ESRD aumenteranno in modo esponenziale nei prossimi 10 anni. Già adesso la patologia renale costituisce la quarta causa di morte da HIV. Lo studio della patogenesi dell'HIVAN è pertanto importante al fine di sviluppare terapie specifiche. Evidenze *in vivo* e sperimentali indicano che HIV causa effetti patologici diretti a livello renale. L'istopatogenesi dell'HIVAN è caratterizzata da un processo di disregolazione (iperplasia e dedifferenziazione) dei podociti. Studi su topi transgenici suggeriscono l'importanza di Nef in tale fenomeno. In questo studio è stato valutato l'effetto diretto di Nef su podociti umani differenziati.

Metodi: Le prove sono state eseguite con Nef ricombinante su una linea di podociti umani differenziati. La proliferazione cellulare è stata valutata mediante BrdU, l'espressione della sinaptopodina con W-B e IF. La sintesi di PAF è stata valutata con un uso di un precursore radioattivo, estrazione e frazionamento dei lipidi con TLC e misurazione della radioattività. L'attivazione di NF- κ B è stata rilevata con EMSA. Prove sono state fatte sui podociti dopo transfezione del gene dell'acetilidrolasi, enzima che determina la degradazione di PAF.

Risultati: Nef stimola in modo specifico la proliferazione dei podociti sia nella sua forma miristilata che non-miristilata. Nef penetra nei podociti, ma l'effetto proliferativo si verifica anche per via extracellulare. Nef riduce inoltre l'espressione della sinaptopodina, marker di differenziazione dei podociti, pur senza alterare la componente actinica del citoscheletro. Un evento precoce indotto da Nef è la sintesi di PAF, potente fattore fosfolipidico rilevato negli estratti cellulari 5 minuti dopo la stimolazione con Nef e che risulta mediarne gli effetti. PAF esercita, infatti, un'attività proliferativa diretta sui podociti che viene ridotta significativamente da WEB2170, inibitore recettoriale di PAF. Per contro, Nef non induce proliferazione in podociti transfettati con acetilidrolasi e quindi non produttori di PAF. Allo stesso modo, l'effetto di riduzione dell'espressione di sinaptopodina viene bloccato dall'uso di inibitori recettoriali di PAF. Come in altri tipi cellulari, Nef causa nei podociti l'attivazione di NF- κ B, evento di signaling che probabilmente concorre alla loro disregolazione. Anche tale evento risulta PAF-mediato, poiché è ridotto in modo rilevante dall'incubazione con WEB2170 e non si verifica in podociti esprimenti acetilidrolasi. Peraltro PAF causa in modo diretto l'attivazione di NF- κ B nei podociti e tale fenomeno può essere bloccato dal pretrattamento con inibitori recettoriali di PAF.

Conclusioni: Lo studio costituisce la prima evidenza che Nef può indurre effetti diretti di disregolazione dei podociti umani e che tali effetti sono mediati da PAF. Stante i risultati già ottenuti relativi all'interazione di Tat coi podociti, è possibile concludere che il danno podocitario tipico dell'HIVAN è riconducibile all'attività di Tat e Nef sui podociti e che gli effetti di signaling indotti dalle proteine virali è principalmente mediato da PAF. Ciò costituisce un razionale all'uso di corticosteroidi e inibitori recettoriali AT1 dell'angiotensina nella terapia dell'HIVAN.

Contributo: 30F.14

DIMINUITA PRODUZIONE DI DIVERSI RNA MITOCONDRIALI NEGLI ADIPOCITI DEI PAZIENTI HIV+ CON LIPODISTROFIA

Andrea Cossarizza* (*Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia*); Marcello Pinti (*) ; Lorenzo Galluzzi (*) ; Erika Roat (*) ; Giovanni Guaraldi (*) ; Gabriella Orlando** (*Azienda Policlinico di Modena*); Leonarda Troiano (*) ; Chiara Giovenzana (*) ; Cristina Mussini (**)

Background: Nei pazienti con infezione da HIV che assumono la HAART contenente farmaci della categoria degli NRTI, le alterazioni mitocondriali rappresentano un importante effetto collaterale. Tali alterazioni sono altresì correlate con l'insorgenza della lipodistrofia. Durante tale sindrome, sono presenti non solo alterazioni della funzionalità del mitocondrio (misurabili con metodiche cellulari quali la valutazione del potenziale di membrana mitocondriale, o con analisi della capacità respiratoria dell'organello), ma anche diminuzioni del DNA mitocondriale, misurabile tramite metodiche molecolari. Le alterazioni sopracitate sono state riportate anche nelle cellule del tessuto adiposo. Per caratterizzare meglio a livello funzionale gli effetti delle modificazioni del mtDNA, abbiamo perciò quantificato la produzione di tre diversi RNA messaggeri prodotti nel mitocondrio del tessuto adiposo di pazienti HIV+ con lipodistrofia.

Metodi: L'RNA totale è stato estratto da tessuto adiposo prelevato da diverse sedi anatomiche di 11 pazienti HIV+ con lipodistrofia, e da 7 soggetti sieronegativi sani, sottoposti ad interventi di chirurgia plastica. L'RNA estratto ha quindi subito la retrotrascrizione, quindi è stata effettuata una originale metodica di real time PCR da noi messa a punto per la quantificazione di 3 trascritti genici, due dei quali (ND1 e CYTB) si trovano sulla cosiddetta catena pesante del DNA mitocondriale, l'altro (ND6) sulla catena leggera. Tali trascritti genici sono stati normalizzati utilizzando come gene housekeeping il prodotto del gene nucleare L13.

Risultati: L'espressione genica di ND1, CYTB e ND6 è notevolmente diminuita negli adipociti dei pazienti con lipodistrofia. La quantificazione di ND1 e ND6 non è risultata differente nei maschi e nelle femmine HIV+, mentre il gene CYTB è significativamente meno espresso negli adipociti delle donne.

Conclusioni: La lipodistrofia associata alla HAART è associata non solo ad una diminuita quantità di mtDNA, ma anche ad una diminuita produzione di mtRNA. Rimane ancora da chiarire il significato della differenza tra i sessi riscontrata nella produzione di RNA per CYTB.

Contributo: 30F.15

IMPIEGO DELL'ACIDO ZOLEDRONICO COME FARMACO INDUTTORE DI ATTIVITÀ ANTIVIRALE IN PAZIENTI CON MALATTIA DA HIV-1 ASINTOMATICI

Gianpiero D'Offizi* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Cristiana Gioia (*); Amina Abideddaim (*); Chiara Agrati (*); Federico Martini (*); Alessandra Sacchi (*); Alessandra Amendola (*); Massimo Tempestilli (*); Rita Bellagamba (*); Miroslav Malkovsky (*University of Wisconsin Madison, WI*); Maria Rosaria Capobianchi (*); Pasquale Narciso (*); Angela Corpolongo (*); Fabrizio Poccia (*)

Background: L'attività di ricerca del nostro gruppo è focalizzata alla comprensione dei meccanismi di immunoricostruzione nell'ospite con infezione da HIV in seguito ad approcci terapeutici innovativi. In particolare, abbiamo osservato che: a) l'immunoterapia con interleuchina 2 ricombinante (IL-2) determina un miglioramento immuno-virologico transiente, b) l'interruzione strutturata della terapia antiretrovirale evidenzia un ruolo dei linfociti T Vgamma9/Vdelta2 nei meccanismi di controllo della viremia. Utilizzando un modello animale (*M. fascicularis*), abbiamo osservato che il trattamento combinato con farmaci bifosfonati ed IL-2 ricombinante è in grado di indurre l'espansione dei linfociti T Vgamma9/Vdelta2 con funzioni effettrici. Dato che i bifosfonati sono già in uso clinico nella terapia oncologica, il nostro studio pilota si propone di valutare l'efficacia antivirale di una terapia a base bifosfonati associati a interleuchina 2 ricombinante in pazienti con infezione da HIV.

Metodi: Lo studio prevede la somministrazione di un bifosfonato (zoledronato) associato ad IL-2 ricombinante. La terapia con zoledronato (4 mg per via endovenosa) viene somministrata soltanto al giorno 1° associandola a IL-2 (3.000.000 UI sottocute). Dal giorno 2° al giorno 5° viene somministrata soltanto l'IL-2 allo stesso dosaggio. I criteri di inclusione nello studio prevedono l'arruolamento di pazienti HIV+ asintomatici non in HAART, con carica virale >50.000 copie/ml e numero di CD4+ >500/mm³. Il follow-up clinico ed immunovirologico dei pazienti è protratto fino a 8 settimane valutando l'efficacia del trattamento nel controllo della replicazione virale e monitorando i possibili effetti tossici legati alla somministrazione dei farmaci.

Risultati: Sulla base delle caratteristiche descritte sono stati sinora arruolati 8 pazienti (7 maschi e 1 femmina). La mediana dell'età è di 42,5 anni (29-44) e i valori viro-immunologici espressi come mediana, al baseline (t0) sono: linfociti CD4+ 604,5/mm³ (524-882), linfociti CD8+ 894,5/mm³ (628-1918), HIV-RNA 107774 cp/ml (58121-500000). Durante il singolo ciclo terapeutico previsto sono stati osservati i seguenti effetti collaterali: febbre (8 pazienti), artromialgie (8 pazienti) nausea (1 paziente), rash cutaneo fugace (2 pazienti). Attualmente è in corso l'analisi dei parametri immunovirologici studiati compresa l'attività immunomodulante sui linfociti T gamma/delta nei pazienti arruolati e la produzione di fattori antivirali non citolitici.

Conclusioni: L'utilizzo di zoledronato associato a IL-2 come immunomodulante non ha mostrato particolari effetti collaterali, che sono stati prevalentemente di tipo simil influenzale e regrediti subito dopo la fine del ciclo terapeutico. L'analisi dei parametri viro-immunologici e la caratterizzazione funzionale dei fattori antivirali prodotti dalle cellule T gamma/delta, attualmente in corso, potrà fornire le basi per lo sviluppo di approcci innovativi della terapia anti-HIV.

Contributo: 30F.20

STUDIO TARGET - TERAPIA ANTIRETROVIRALE IN GRAVIDANZA: EFFICACIA E TOSSICITÀ

Antonella D'Arminio Monforte* (*Istituto di Malattie Infettive, Ospedale L. Sacco, Milano*); Elisabetta Chiesa (*) ; Simona Fiore** (*Clinica Ostetrico-Ginecologica, Ospedale L. Sacco, Milano*); Teresa Bini (*) ; Andrea Cossarizza (*Cattedra di Immunologia, Università degli Studi di Modena*); Mario Clerici (*Cattedra di Immunologia, Università degli Studi di Milano*); Stefano Bonora (*Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi di Torino*); Claudia Balotta (*) ; Enrico Ferrazzi (**)

Background: L'utilizzo della terapia antiretrovirale (ARV) in gravidanza è efficace nella riduzione della trasmissione verticale; sono controversi i dati sulla tossicità materna e fetale e su durata ed esito della gravidanza.

Metodi: Studio prospettico, osservazionale nazionale in 23 centri infettivologici e ginecologici che si propone di valutare diversi aspetti della tossicità della ARV su donna gravida, gravidanza e feto tramite l'esecuzione dei seguenti sottostudi: farmacocinetica, studio della funzione citochinica, valutazione della tossicità mitocondriale su sangue e grasso sottocutaneo prelevato al taglio cesareo, resistenza genotipica, studio di farmacogenomica con sequenziamento dei geni coinvolti nel trasporto transmembrana dei farmaci e nel controllo dell'infezione da HIV.

Risultati: Dal 25/6/2004 sono state arruolate 59 donne in 11 centri. Sono stati stoccati 469 campioni di plasma per banca biologica, 226 campioni di plasma per studio di farmacocinetica (80 nel I trimestre, 51 nel II, 49 nel III, 29 al parto e 17 postpartum), 350 campioni di cellule per lo studio immunologico (120 campioni) e per lo studio di tossicità mitocondriale (230 campioni), 13 campioni di grasso sottocutaneo per lo studio di tossicità mitocondriale su adipociti, 33 coppie di campioni di sangue intero materno e cordonale per studio di farmacogenomica e 23 coppie di campioni di plasma materno e cordonale per lo studio di farmacocinetica del passaggio transplacentare. L'analisi dei campioni inizierà con lo studio di farmacocinetica entro il mese di giugno. Sono disponibili i dati al baseline per 44 gravidanze; l'età mediana è 33 anni (range 17-43), al concepimento 4 pz. (10%) erano in stadio C, 13 erano naïve e 8 avevano avuto la diagnosi di infezione da HIV durante la gravidanza. Nelle 31 pz. pretrattate, la ARV al concepimento conteneva IP in 12 pz. (38,7%), NNRTI in 13 (41,9%), (7 con EFV), 2 pz. (6,5%) assumevano sia IP che NNRTI. Il nadir mediano dei CD4+ era di 271 cell/mm³, il picco mediano di HIV-RNA era di 4,73 log₁₀ copie/ml. Durante la gravidanza 17 pz. (54,8%) hanno assunto una HAART con IP, 19 pz. (61,3%) con NNRTI, 3 (6,8%) con entrambi, 4 pz. (9%) sono in sospensione terapeutica nel I trimestre. Al 15/3/05 16 donne hanno partorito, di cui 5 con TC in urgenza.; 3 pz. hanno partorito prima della 37° sett. Si sono verificati 4 aborti spontanei. 10 donne (22,7%) hanno sviluppato eventi avversi: 2 iperemesi gravidica, 1 anemia, 1 diabete, 1 incontinenza cervicale, 1 infezione ferita chirurgica, 3 rash cutaneo da NVP, 1 sospetta reazione di ipersensibilità da ABC. Sono stati osservati 2 casi di trasmissione verticale di HIV: uno in una pz resistente al trattamento effettuato dalla 14°sett. con AZT+3TC+NVP e modificato alla 21° in d4T+3TC+LPV/r; il secondo in una pz multifallita, trattata con ddI+TDF+NFV con HIV-RNA sempre >4log₁₀copie/ml. È stata osservato un caso di esadattilia in un neonato da madre trattata con AZT+3TC+NVP dalla 22° sett.

Conclusioni: la trasmissione verticale si è verificata in pazienti che hanno effettuato ARV non ottimali per la presenza di resistenze, l'unica malformazione osservata non è correlabile alla ARV.

Contributo: 30F.16

RESISTENZA DI HIV-1 AGLI INIBITORI NUCLEOSIDICI E NUCLEOTIDICI DELLA TRASCRIPTASI INVERSA COMPONENTI VIROLOGICHE E CELLULARI DI FARMACORESISTENZA, LORO RILEVAZIONE, DETERMINANTI DI SVILUPPO ED INFLUENZA SULLE SCELTE TERAPEUTICHE SEQUENZIALI

Andrea De Luca (*Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Carlo Federico Perno* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Alessandro Cozzi Lepri (*Royal Free Hosp*); Claudia Balotta** (*Università degli Studi di Milano*); Andrea Antinori (*); Guido Antonelli (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Antonella D'Arminio Monforte (**)

Background: Analisi preliminari su casistiche retrospettive multicentriche (De Luca A e Cozzi Lepri A) sembrano indicare: a) una netta tendenza al clustering delle mutazioni associate a resistenza agli analoghi nucleosidici (NAM) in almeno 2 gruppi distinti, che giocano un ruolo differente nel conferire resistenza crociata ai diversi farmaci della classe; b) l'esposizione *in vivo* a regimi contenenti stavudina e zidovudina sembra associata alla selezione di distinti pattern mutazionali di NAM.

Metodi: Il progetto, al momento in attesa di ricevere il finanziamento, si prefigge di studiare, nella coorte ICONA, i seguenti aspetti: 1) Verranno analizzate le sequenze virali di RT e proteasi da pazienti che abbiano iniziato HAART con disponibile 1 campione di plasma preterapia ed uno al fallimento virologico (dopo il primo VL>1.000): 102 pazienti che inizino AZT-containing HAART, 42 D4T-containing HAART, 20 TA-free HAART. Verranno analizzati lo sviluppo di pathways mutazionali, ricercando i seguenti eventi genotipici: presenza e numero di NAMs (41L, 44D, 67N, 70R, 118I, 210W, 215Y/F, 219Q/E); sviluppo di NAM1 (67N, 70R, 219Q/E, 215F) o NAM2 (41L, 210W, 215Y) con o senza 44D o 118I o 115F; sviluppo di MNR 1 (151M con 62v o 75I o 77L o 116Y) o 2 (inserzione 69 con o senza 62V e/o NAMs); 74V; 75M/S/A/T; 65R; tutte le precedenti con/senza 184V/I. L'analisi dei predittori degli eventi citati verrà eseguita mediante regressione logistica. Le sequenze basali verranno impiegate allo scopo di verificare il ruolo delle resistenze trasmesse e il valore predittivo di mutazioni non canonicamente riconosciute come associate a resistenza nel predire l'evoluzione del genotipo virale 2) Analisi del time to genotypic resistance utilizzando tutti i pazienti di ciascun gruppo (AZT, d4T e TA-sparing) ed andando a testare tutti i campioni della fase viremica (>1.000) disponibili: AZT=283; D4T=170;TA-sparing=40. Questo permetterà di stimare in un'analisi attuariale la probabilità di mutazioni quali definite al punto 1. 3) Nei pazienti che effettuano uno switch terapeutico dopo fallimento e che passano da un analogo timidinico all'altro, da un regime timidinico ad uno non timidinico e vice versa, la farmacoresistenza determinata al punto 2. verrà correlata al time to virological failure usando curve di Kaplan Meier e modelli di Cox uni- e multivariati Come ulteriore endpoint per valutare la risposta virologica a seconda del pattern di resistenza trovato verrà analizzata la variazione della viremia a settimana 8, 16 e 24 (quando disponibili) rispetto al livello pre-terapia. 4) In un sottogruppo dei pazienti al punto 3. verranno analizzate le sequenze RT e proteasi di DNA provirale; queste verranno confrontate con le sequenze di RNA virale plasmatico e verrà analizzata la capacità predittiva di risposta con le modalità indicate al punto 3. 5) L'attività degli enzimi principalmente coinvolti nella attivazione degli analoghi nucleosidici e nucleotidici sarà valutata, mediante saggi enzimatici, nelle PBMC da sottogruppi di pazienti esposti ai diversi NRTI. Con lo stesso materiale si procederà inoltre all'analisi quantitativa dell'espressione degli mRNA per le principali proteine ad attività di trasporto (MDR e MRP).

Contributo: 30F.17

VALUTAZIONE DEL RUOLO DI MUTAZIONI DELLA PROTEASI NELLA RISPOSTA VIROLOGICA A REGIMI HAART CONTENENTI RITONAVIR/SAQUINAVIR

Simona Di Giambenedetto* (*Malattie Infettive, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Mattia Prosperini** (*Università degli Studi di Roma "Tre"*); Antonella Cingolani (*) (*John Baxter (Cooper Hospital/UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical School, Camden, NJ, USA)*); Lidia Ruiz (*Hospital Universitari Germans Trias Pujol, Badalona, Spain*); Philippe Clevenbergh (*HOSPITAL Lariboisiere, Paris, France*); Carlo Federico Perno (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Andrea Antinori (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Giovanni Ulivi (**); Andrea De Luca (*)

Background: L'interpretazione genotipica delle mutazioni di resistenza di regimi HAART contenenti saquinavir con ritonavir (SQV/r) è ancora incompleta e limitata dalla mancanza di dati tra resistenze genotipiche e risposta virologica al SQV/r.

Metodi: Sono stati analizzati pazienti che presentavano dati clinici, viro-immunologici e test di resistenza genotipici al basale e a 3 mesi e che avevano effettuato regimi di salvataggio contenenti SQV/r. Tali pazienti sono stati estratti dagli studi Argenta, GART, Havana e dalla coorte prospettica dell'INMI Spallanzani. L'associazione tra le singole mutazioni nella regione delle proteasi e la risposta virologica a tre mesi (3 m delta VL) è stata effettuata mediante regressione lineare multipla dopo aggiustamento con la dose di ritonavir e dopo aver assegnato pesi diversi alle singole mutazioni, in rapporto al loro coefficiente di correlazione con 3 m delta VL. In parallelo è stata testata la risposta ottenuta mediante un sistema di intelligenza artificiale basato sugli "algoritmi genetici", con ricerca automatizzata della migliore correlazione tra genotipi a risposta virologica analizzando tutte le possibili combinazioni di mutazioni anche con assegnazione di pesi variabili (tra 0 e 1) alle medesime.

Risultati: Sono stati analizzati 129 pazienti. La media +SD della viremia basale era di 4.25+0.65 log e la media del 3 m delta VL era -1.05+1.10 log; il 38% che raggiungeva a 3 mesi VL<500 copie/ml. Il ritonavir era stato impiegato a dose terapeutica (400 mg bid) nel 94% dei pazienti. Le mutazioni associate ad una riduzione del 3 m delta VL erano quelle ai codoni 10, 46, 48, 82, 84 e 90 (p<0.05), e nelle posizioni 24 e 32 (p<0.20). Una migliore correlazione con 3 m delta VL si è ottenuta con lo score (2 x 10)+24+32+(2 x 46)+(2 x 48)+82+(2 x 84)+(2 x 90): per ogni incremento di score, la modifica media del 3 m delta VL era pari a +0.13 log (95% CI +0.06, +0.19) con R=0.33; con uno score tra 0-3 (=susceptibilità) la media+SE del 3 m delta VL era -1.32+0.12 log, con uno score 4-8 (=resistenza intermedia) -0.62+0.15 log e con lo score>9 (=resistenza) +0.01+0.15 log (R=0.35). La correlazione con 3 m delta VL ottenuta impiegando gli algoritmi genetici era R=0.70. Le mutazioni associate ad una peggiore risposta virologica a SQV/r erano nelle posizioni: 13, 32, 37, 57, 69, 71, 84, 90 e 93, mentre le mutazioni alle posizioni 54, 62 e 73 erano associate ad una migliore risposta. Le mutazioni in posizione 10, 46 e 82 non apparivano influenzare la risposta virologica.

Conclusioni: L'impiego di uno score formato mediante assegnazione di diversi pesi alle mutazioni delle proteasi è associato ad una migliore predizione della risposta virologica a regimi HAART di salvataggio contenenti SQV somministrato con ritonavir, generalmente con una dose di 400+400 mg bid. L'impiego di algoritmi genetici prefigura un ulteriore affinamento della predizione della risposta virologica. Tali risultati richiedono validazione clinica su un set di pazienti indipendente.

Contributo: 30F.18

SINTESI, SAGGI ENZIMATICI E ATTIVITÀ ANTIVIRALE DI NUOVI INIBITORI DELL'INTEGRASI DI HIV

Roberto Di Santo* (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Roberta Costi (*); Marino Artico (*); Alessandra Roux (*); Michela Forte (*); Gaetano Miele (*); Annateresa Palamara (*); Yves Pommier** (*NIH*); Christophe Marchand (**); Lucia Palmisano*** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Mauro Andreotti (**); Maria Clementina Galluzzo (**); Lucia Nencioni (*); Ettore Novellino (*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*)

Background: Il passaggio dalla monoterapia anti-HIV all'HAART ha segnato un rapido mutamento nell'immagine dell'AIDS, che è così uscita dal novero delle malattie incurabili. Lo sviluppo di resistenza ai farmaci utilizzati è però solo rallentata nell'HAART che prevede sia il blocco dell'azione dell'RT che della PR. Il continuo aumento di ceppi multiresistenti rende quindi impellente la necessità di individuare nuovi farmaci anti-integrasi (IN), il terzo enzima fondamentale per lo svolgimento del ciclo replicativo dell'HIV. Un blocco contemporaneo dei tre enzimi potrebbe infatti contribuire al miglioramento delle possibilità terapeutiche per l'AIDS. L'IN costituisce un target attraente per lo sviluppo di nuovi farmaci perché: i) svolge un ruolo determinante nel ciclo replicativo virale; ii) nelle cellule eucariotiche non è presente un enzima analogo; iii) ad oggi non sono noti IN-inibitori entrati nell'uso clinico. L'obiettivo di questo studio consiste nella progettazione, sintesi e screening di nuovi composti anti-HIV capaci di bloccare il ciclo di replicazione a livello dell'integrazione nel DNA. L'esperienza che il nostro gruppo ha maturato fin dalla metà degli anni 90 nella progettazione e sintesi di inibitori dell'integrasi ci ha portato a progettare aril dicheto acidi (DKA) derivati dell'acido 4-(1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoico ed acidi pirroildichetoeseñoici.

Metodi: - Design di nuovi inibitori viniloghi e bioisosteri di prodotti DKA anti-IN noti in letteratura.
- Tecniche di sintesi in parallelo mediante utilizzo di sintetizzatore a 24 postazioni (Syncore). Sui composti ottenuti sono stati effettuati i seguenti saggi:
- valutazione dell'inibizione enzimatica (test del 3'-processing e dello strand transfer) in presenza di Mn⁺⁺ e nel caso di composti potenti anche in presenza di Mg⁺⁺.
- valutazione di EC50 e EC90 su cellule infettate: i) infezione di cellule H9 con un ceppo virale HTLV-III_B a titolo noto; ii) coltivazione in presenza di concentrazioni scalari di di farmaco (da 0.1 a 50 microM); iii) quantificazione della proteina p24 nei sovrantanti di coltura al quarto giorno di infezione;-valutazione della tossicità del farmaco tramite colorazione con il Trypan blue e MTT.

Risultati: Sono stati sintetizzati 56 prodotti, 38 dei quali sono stati saggiati su rIN presso l'NIH. Tra questi, 22 composti sono risultati potenti inibitori dell'enzima a concentrazioni submicromolari. In particolare 9 prodotti hanno mostrato valori di inibizione tra i 15 e i 40 nM (ST). Gli inibitori ottenuti sono risultati selettivi per lo step dello ST. 45 dei 56 iniziali sono stati testati su cellule infettate: per 17 di essi è stato possibile calcolare una IC50 (valori compresi tra 2.9 e 29.4 microM; per 4 è stato possibile calcolare una IC90 (valori compresi tra 32.8 e 40 microM).

Conclusioni: Nella prima fase di questo studio sono stati progettati e sintetizzati potenti inibitori dell'IN selettivi per lo ST attivi anche in cellule infettate da anti-HIV-1. I risultati ottenuti ci incoraggiano a proseguire questa linea di ricerca, e nel prossimo futuro, con l'aiuto del molecular modeling, ci proponiamo di incrementare l'attività dei composti ottenuti e di portare nuove informazioni sul meccanismo di azione dell'IN.

Contributo: 30F.19

ELIMINAZIONE SELETTIVA DI CELLULE INFETTE DA HIV PER MEZZO DI “VIRAL-LIKE PARTICLES”

Silvia Peretti* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Ilaria Schiavoni (*); Katherina Pugliese (*); Paola D'Aloja (*); Maurizio Federico (*)

Background: Nonostante la HAART si è dimostrata efficiente nel ridurre drasticamente il rilascio di HIV dai linfociti infettati, questa strategia terapeutica non si sta dimostrando altrettanto efficace nell'eliminazione dei cosiddetti “virus sanctuaries” costituiti da cellule persistentemente infette quali macrofagi, cellule dendritiche, astrociti, o linfociti CD4 “resting” o quiescenti latentemente infetti. La loro eliminazione è stata tentata per mezzo di diversi protocolli di trattamento con citochine o farmaci, che purtroppo per lo più hanno generato stati di attivazione non-specifica che hanno portato ad un aumento della diffusione del virus. Nel tentativo di contribuire alla messa a punto di prodotti terapeutici innovativi in grado di attaccare le cellule persistentemente infette, abbiamo generato una serie di “Virus-Like Particles” (VLP) in grado di riconoscere e di uccidere selettivamente le cellule infette da HIV. Queste VLP si basano sulla eccezionale capacità di un mutante della proteina HIV-1 Nef (denominato Nef7) di incorporarsi in particelle lentivirali prive di genoma (circa 100 volte più efficientemente rispetto a wtNef) e di fungere da molecola cargo quando è parte N-terminale di proteine di fusione. Inoltre, la pseudotipizzazione delle VLP con i recettori cellulari dell'HIV ne permette l'ingresso selettivo nelle cellule infettate esprimenti i prodotti Env sulla membrana cellulare per mezzo del fenomeno di “fusione inversa”. In particolare, nel presente lavoro, sono state utilizzate VLP caricate con le proteine chimeriche Nef7/GFP e Nef7/HSV-TK (timidina kinasi del virus Herpes Simplex-1).

Metodi: Per ottenere le VLPs in grado di riconoscere selettivamente cellule infette da HIV ed incorporanti alte quantità o di Nef7/GFP o di Nef7/TK, cellule 293T sono state trasfettate con un costrutto “packaging” di HIV-1, con il vettore esprimente il rispettivo derivato di Nef7, e con i vettori esprimenti i recettori umani CD4 e CXCR4 o CCR5. Le particelle virali emergenti sono state concentrate, purificate e caratterizzate molecolarmente per il contenuto proteico. Cellule infettate da ceppi X4 o R5 di HIV-1 sono state quindi trattate con le suddette VLP e, per gli studi di internalizzazione, analizzate al FACs per la presenza intracellulare di Nef7/GFP. Inoltre, per gli studi sugli effetti citotossici delle VLP, cellule infettate da HIV-1 sono state trattate con VLP Nef7/TK e coltivate con Ganciclovir (GCV), e la loro vitalità esaminata fino a dieci giorni dal trattamento con le VLP.

Risultati: Le su descritte metodologie si sono dimostrate efficaci nel produrre VLP effettivamente pseudotipizzate con i recettori cellulari dell'HIV, nonché incorporanti alti livelli di Nef7/GFP o Nef7/TK. Abbiamo dimostrato l'efficiente internalizzazione di Nef7/GFP VLP in cellule infettate con ceppi sia X4 che R5 di HIV-1. Inoltre, le (CD4-CXCR4)Nef7/TK VLP si sono dimostrate efficaci nell'uccidere selettivamente linee linfocitarie infettate con X4 HIV-1 coltivate in presenza di GCV, mentre le Nef7/TK VLP pseudotipizzate con CD4 e CCR5 hanno efficientemente portato a morte macrofagi primari umani infettati con R5 HIV-1 coltivati con GCV.

Conclusioni: I nostri risultati rappresentano la prova di principio che le Nef7/TK VLP possono essere considerate come un buon candidato per lo sviluppo di terapie innovative atte all'eliminazione di cellule persistentemente infette resistenti alla HAART.

Contributo: 30F/D

COINVOLGIMENTO DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE NELL'APOPTOSI INDOTTA DALLA GP120 NELLA CORTECCIA DI RATTO

Monica Bari (*Dip. di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" – Dip. di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Teramo*); Paola Spagnuolo (*Dip. di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" – Dip. di Scienze Farmacobiologiche, Università della Calabria, Cosenza*); Silvia Piccirilli* (*IRCCS, Centro per la Neurobiologia Sperimentale C. Mondino, Mondino, Tor Vergata, Santa Lucia, Roma*); Claudio Del Duca (*); Giuseppe Nappi (*); M. Tiziana Corasaniti (*Dip. di Scienze Farmacobiologiche, Università degli Studi di Catanzaro "Magna Graecia"*); Alessandro Finazzi Agrò (*Dip. di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Giacinto Bagetta (*Dip. di Scienze Farmacobiologiche, Università della Calabria, Cosenza*); Mauro Maccarrone (*Dip. di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Teramo – Dip. di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*)

Background: La proteina gp 120, presente nel capsido del virus HIV-1, causa apoptosi nella corteccia cerebrale di ratto. Questo tipo di morte cellulare può essere implicata nella perdita neuronale osservata nel cervello post-mortem di pazienti affetti da sindrome neurologica associata all'AIDS. In questo lavoro abbiamo analizzato il possibile ruolo del sistema endocannabinoide in questo processo.

Metodi: Studio *in vivo* su ratti dopo somministrazione subcronica per via intracerebroventricolare (i.c.v.) di gp 120 del virus HIV-1. Studio dell'attività di idrolisi (FAAH), di sintesi (NAPE-PLD), e del trasporto (AMT) dell'Anandamide da estratti proteici della corteccia di ratto, mediante l'uso di substrati radioattivi, e di HPLC e B-counter per l'analisi dei dati. Studio del recettore cannabico (CB) su membrane purificate dalla corteccia di ratto. Uso della tecnica TUNEL per lo studio dell'apoptosi.

Risultati: È stato dimostrato che la gp120 provoca un aumento, tempo-dipendente dell'attività e dell'immunoreattività dell'enzima (FAAH, fatty acid amide hydrolase) responsabile della degradazione dell'endocannabinoide N-arachidonoiletanolamina (anandamide; AEA). Parallelamente induce un aumento dell'attività del trasportatore di membrana dell'AEA ed una diminuzione dei livelli endogeni di AEA, mentre l'enzima che sintetizza l'endocannabinoide, NAPE-PLD (N-acylphosphatidylethanolamine-phospholipase C) ed il recettore cannabico (CB) a cui si lega l'AEA non vengono influenzati dall'azione della gp120. Inoltre l'attività della 5-lipossigenasi, che produce derivati dall'AEA in grado di inibire l'attività della FAAH, viene ridotta del 25% rispetto al controllo dopo trattamento con la gp120. In fine il trattamento con un inibitore della FAAH, il MAFP, riduce significativamente l'apoptosi indotta dalla gp120, mentre inibitori selettivi del trasportatore o del CB non hanno alcun effetto.

Conclusioni: Questi risultati suggeriscono che la gp120, attivando la FAAH, riduce i livelli endogeni di AEA e tale effetto sembra essere lo strumento attraverso il quale viene indotta l'apoptosi nella corteccia di ratto.

Contributo: 30F.21

STUDIO MULTICENTRICO INITIO

Marco Floridia* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Maurizio Massella (*); Marco Mirra (*); Cosimo Polizzi (*); Alessandra Mattei (*); Maria F. Pirillo (*); Elena A. P. Germinario (*); Federica Innocenti (*); Vincenzo Fragola (*); Raffaella Bucciardini (*); Margherita Guidi; Maria Luisa Paoloni; Stefano Vella (*)

Background: L'INITIO è un ampio studio clinico a cui hanno partecipato paesi di Europa, Oceania ed America Settentrionale e Meridionale. Allo scopo di confrontare l'efficacia a lungo termine di tre diverse strategie terapeutiche, oltre 900 pazienti, mai trattati in precedenza, sono stati randomizzati ad uno di tre regimi, per ricevere, rispettivamente (in associazione ad una base comune di due analoghi nucleosidici, d4T e ddI), un inibitore non nucleosidico della trascrittasi inversa (efavirenz), un inibitore della proteasi (nelfinavir), o la loro associazione.

Metodi: Studio randomizzato multicentrico in aperto di fase III. Popolazione: pazienti mai trattati precedentemente con antiretrovirali, età >18, qualsiasi valore di CD4 e qualsiasi stadio di malattia da HIV esclusa l'infezione primaria acuta sintomatica. Trattamenti: S1 (strategia 1): ddI+d4T+EFV; S2: ddI+d4T+NfV; S3: ddI+d4T+EFV+NfV. Endpoint primari: variazione nel numero di cellule CD4+ a 3 anni; percentuale di pazienti con HIV-RNA inferiore a 50 copie/ml a 3 anni.

Risultati: Il numero finale di arruolamenti è risultato di 911 pazienti in 18 paesi. In Italia sono stati arruolati 59 pazienti in 13 centri clinici. La durata mediana del follow-up è stata di 192 settimane (3.7 anni). Alla chiusura del follow-up (30 giugno 2004), 120 pazienti (13%) non avevano informazioni di follow-up per i sei mesi precedenti. Complessivamente, il 63% del tempo di follow-up (74% S1, 63% S2, 51% S3) è stato trascorso nel regime iniziale (considerando mantenuto il regime iniziale anche nel caso di sostituzioni di farmaci entro la stessa classe). La percentuale di pazienti con RNA<50 copie a tre anni è risultata maggiore nel braccio S1 (74%) rispetto ai bracci S2 (62%) o S3 (62%). Non si sono osservate differenze fra le tre strategie nelle variazioni a 3 anni delle cellule CD4: i cambiamenti mediani erano i seguenti: +275 (IC 95% 239 - 310) cellule x10⁶/l nel gruppo S1, +276 (IC 95% 242 - 311) nel gruppo S2 e +261 (CI 95% 225 - 296) nel gruppo S3. L'analisi della resistenza ai farmaci e dei risultati dei sottostudi (immunologico, virologico e di qualità della vita) è prevista per il 2005.

Conclusioni: Lo studio ha fornito importanti informazioni sul trattamento di prima linea con farmaci di diverse classi.

Partecipanti e centri clinici in Italia: G. Pastore, N. Ladisa, E. Cinori, F. Silvestris, Università e Policlinico di Bari; M. Caremani, R. Maestrini, D. Tacconi, P. Giorni, D. Mariotti, Azienda USL 8, Arezzo; G. Marani Toro, G. D'Amico, G. Placido, L. Cosentino, G. Riario Sforza, L. Clerico, Ospedale Civile, Pescara; T. Ferraro, L. Cosco, M. Ciappelloni, R. Masciari, N. Della Dora, Ospedale A. Pugliese, Catanzaro; A. Lazzarin, G. Tambussi, B. Capiluppi, V. Rusconi, C. Fortis, G. Poli, L. Soldini, Istituto Scientifico S. Raffaele, Milano; T. Zauli, A. Catania, E. Prini, E. Briganti, M. Gardini, F. Santandrea, C. Troncossi, C. Staffa, F. Albertini, L. Focaccia, G. Monti, M. R. Minzi, Azienda USL di Ravenna; A. Orani (investigatore nazionale per lo studio), P. Perini, G. Erba, I. Guarnori, M. Gatti, C. Marchesi, Ospedale di Lecco; L. Ortona, R. Cauda, A. De Luca, S. Di Giambenedetto, C. Rumi, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma; P. Viganò, M. Mena, R. Citterio, R. Chianese, Ospedale di Cuggiono; C. Pieretti, M. Acetosio, M. Valentini, Ospedale Civile di Pesaro; G. Penco, N. Piersantelli, A. Greci, A. Terrile, P. Strada, M. Mori, E.O. Ospedali Galliera, Genova; E. Pizzigallo, F. Ricci, P. G. Giuri, A. L. Di Mele, Università G. D'Annunzio, Chieti; E. Raise, S. Pasquinucci, C. Ortolani, G. Penso, Ospedale S. Giovanni e Paolo, Venezia.

Contributo: 30F/E

PROGETTO PER LA SORVEGLIANZA NAZIONALE SUL TRATTAMENTO ANTIRETROVIRALE IN GRAVIDANZA

Marco Floridia* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Cosimo Polizzi (*); Alessandra Mattei (*); Maria F. Pirillo (*); Roberta Amici (*); Clementina M. Galluzzo (*); Elena A. P. Germinario (*); Stefano Vella (*)

Background: Il progetto, coordinato dall'ISS, è uno studio osservazionale nazionale aperto ad infettivologi, ostetrici e pediatri interessati alla valutazione del trattamento antiretrovirale in gravidanza.

Metodi: Si avvale di tre differenti reti di raccolta dei dati: 1) Gruppo di Studio Nazionale SIGO sull'Infezione da HIV; 2) Gruppo Laziale per lo Studio della Donna HIV Positiva in Gravidanza e del suo Bambino; 3) centri infettivologici direttamente coordinati dall'ISS.

Risultati: Al 15.2.2004 sono pervenute da 31 centri oltre 900 segnalazioni di gravidanza, e sono disponibili dati di esito per oltre 400 gravidanze. Le informazioni raccolte riguardano aspetti demografici e clinici, andamento clinico ed immunologico durante la gravidanza, uso di antiretrovirali durante la gravidanza ed il parto, ricoveri, esiti e durata della gravidanza. La frequenza di gravidanze non pianificate è risultata non inferiore al 50%, e quella di diagnosi di HIV in corso di gravidanza intorno al 25% circa; il 60-65% delle donne hanno contratto l'HIV per via sessuale, ed il 25-30% sono di nazionalità non italiana. La maggior parte delle donne all'inizio della gravidanza è in buone condizioni clinico-immunologiche (80% circa asintomatiche, media CD4: 500), ed ha già svolto trattamento antiretrovirale. Circa metà delle donne è già in terapia antiretrovirale al concepimento, ed oltre il 20% di queste lo è con regimi o trattamenti controindicati (EFV 14%, combinazione d4T+ddI, 10%). Al momento i dati non suggeriscono un impatto negativo della gravidanza sulla progressione dell'infezione da HIV. Tuttavia alcuni casi di infezione da HIV nella madre vengono tuttora identificati al momento del parto o addirittura in epoca successiva, e si è purtroppo verificata la trasmissione di HIV da madre a neonato in un caso caratterizzato da assenza di qualsiasi trattamento preventivo in gravidanza o al parto.

Conclusioni: I risultati sottolineano la necessità di rinforzare i programmi di *counselling* prenatale e di informazione e screening per HIV nella popolazione generale, e di considerare nella scelta dei regimi di trattamento antiretrovirale nelle donne HIV-positive in età fertile la frequente insorgenza di gravidanze non pianificate.

Coordinatori del Progetto: M. Floridia, M. Ravizza, E. Tamburrini. Partecipanti: P. Ortolani, E. R. dalle Nogare, G. Sterrantino, M. Meli, M. Mazzetti, B. Borchi, E. Pinter, E. Anzalone, L. Roberti, A. Carocci, E. Grilli, A. Maccabruni, A. Moretti, G. Natalini, G. Guaraldi, C. Vanzini, F. Sabbatini, A. Zoncada, A. Degli Antoni, A. Molinari, P. Rogasi, M. P. Crisalli, F. Mori, E. Chiesa, G. Placido, M. Dalessandro, S. Alberico, M. Bernardon, A. Meloni, A. Citerinesi, M. F. Ravagni Probizer, A. Vimercati, B. Guerra, M. Sansone, C. Tibaldi, A. Calcagno, S. Marini, G. Masuelli, L. Di Lenardo, E. Ferrazzi, V. Conserva, T. Brambilla, E. Rubino, A. Bucceri, R. Matrone, G. Scaravelli, G. Anzidei, R. Cavallini, C. Fundarò, O. Genovese, E. Tamburrini, C. Cafforio, C. Pinnetti, G. Liuzzi, V. Tozzi, P. Massetti, M. Anceschi, A. M. Casadei, F. Montella, A. F. Cavaliere, M. Finelli, C. Riva, M. Cellini, V. Venturi, M. Lanari, S. Garetto, G. Castelli Gattinara, M. Ravizza, L. Mangiarotti, M. Ierardi, S. Foina, B. Salerio, S. Dalzero, A. Mattei, C. Polizzi, E. Germinario, M. F. Pirillo, R. Amici, C. M. Galluzzo, M. Floridia. Farmacocinetica: M. Regazzi, P. Villani. Advisory Board del progetto: A. Cerioli, M. De Martino, P. Mastroiacovo, M. Moroni, F. Parazzini, G. Pardi, E. Tamburrini, S. Vella. Coordinamento Nazionale Gruppo di Studio SIGO sull'Infezione da HIV in Gravidanza: E. Ferrazzi, P. Martinelli.

Contributo: 30F/F

POLIMORFISMO GENETICO -670 DI FAS E RISCHIO DI LIPOATROFIA IN UNA COORTE DI PAZIENTI HIV-1 POSITIVI ARRUOLATI NELLA COORTE LIPO-ICONA

Massimo Galli* (*Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi di Milano*); Andrea Cossarizza** (*Cattedra di Immunologia, Università degli Studi di Modena*); Agostino Riva (*); Milena Nasi (**); Antonella D'Arminio Monforte (*); Alessandro Cozzi Lepri (*University College, Medical School, London*); Marcello Pinti (**)

Background: I meccanismi che portano allo sviluppo della lipoatrofia in pazienti HIV-1 positivi sottoposti a terapia antiretrovirale non sono ancora stati completamente chiariti. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare le possibili interazioni tra specifici polimorfismi di geni legati all'apoptosi e lo sviluppo della lipoatrofia (LA).

Metodi: Tra il 1997 e il 2000 abbiamo arruolato nella Lipo-I.Co.N.A 845 pazienti, i quali avevano iniziato la terapia antiretrovirale, e che sono stati monitorati per l'insorgenza di anomalie morfologiche del tessuto adiposo. La perdita e/o l'accumulo di grasso nelle diverse parti del corpo sono state riportate dai pazienti stessi e confermate da valutazioni cliniche ad ogni visita ambulatoriale. Da un campione di 211 pazienti, dei quali erano disponibili le cellule, è stato estratto il DNA genomico e sono stati analizzati i polimorfismi di alcuni geni legati all'apoptosi: TNFalfa -238, TNFalfa -308, Fas -670 e Fas -1377. L'analisi statistica dei dati crudi di LA (definiti al momento della prima osservazione di perdita di grasso in qualunque sede) e dei rischi relativi aggiustati è stata effettuata attraverso la regressione di Poisson.

Risultati: Nella popolazione studiata, il 28.1% erano donne, il 38.0% tossicodipendenti per via endovenosa, il 19.9% avevano contratto l'infezione attraverso rapporti omosessuali e il 36.2% attraverso rapporti eterosessuali. L'età media era 36 (range: 18-55); la percentuale della coinfezione HIV/HCV era del 40.8%. Abbiamo osservato 137 casi di LA su un totale di 2,021 person year di follow-up (PyFU) (una media di 2.39 yFU per paziente). I fattori associati con LA nella coorte sono il sesso (RR femmina vs maschi di 1.84, 95% CI: 1.12-3.01), la carica virale attuale (RR=0.65 per ogni log₁₀ maggiore, 95% CI: 0.52-0.83), l'uso attuale di stavudina/lamivudina (RR=1.78 vs zidovudina/lamivudina, 95% CI: 1.10-2.87) e al riscontro l'uso di inibitori della proteasi rispetto all'uso di efavirenz (RR=2.25 per indinavir, 95% CI: 1.05-4.82 e RR=2.35 per nelfinavir, 95% CI: 1.00-5.53). Nel sottogruppo di pazienti nei quali è stato analizzato il genotipo, la distribuzione del polimorfismo -670 di Fas era A/A (n=83, 39.3%), A/G (n=80, 37.9%) e G/G (n=48, 22.8%). I corrispondenti valori grezzi di LA erano: 11.1 per 1,000 PYFU (95% CI: 7.2-16.3), 4.9 (2.5-8.6) e 5.1 (2.1-10.5) rispettivamente. Dopo aver normalizzato tali valori per sesso, durata dell'infezione, età, carica virale attuale, sierologia per HCV, regime terapeutico attuale, polimorfismo -308 di TNF alfa e mesi di terapia con NRTI pre-HAART, il rischio relativo di LA confrontando il genotipo A/G con il genotipo A/A era 0.40 (95% CI: 0.16-0.99, p=0.05). Gli altri genotipi considerati nello studio e l'aplogruppo (la combinazione dei polimorfismi di Fas) non hanno mostrato un'associazione significativa con il rischio di LA.

Conclusioni: I meccanismi molecolari che stanno alla base della LA in pazienti in terapia HAART sono sicuramente di natura multifattoriale. Il nostro studio suggerisce che, a parità di alcune condizioni tra cui l'uso di specifici farmaci antiretrovirali, il genotipo -670 A/G di Fas possa essere associato a un minor rischio di sviluppare LA rispetto al genotipo A/A.

Contributo: 30F.22

INTERRUZIONE PROGRAMMATTA DELLA TERAPIA GUIDATA DAI CD4 IN BAMBINI CON INFEZIONE CRONICA DA HIV (STUDIO PENTA 11)

Osvalda Rampon* (*Dip. di Pediatria, Università degli Studi di Padova*); Federica Fregonese (*); Martina Penazzato (*); Marisa Zanchetta** (*Istituto di Oncologia, Università degli Studi di Padova*); Ruggiero D'Elia (*); Anita De Rossi (**); Carlo Giaquinto (*)

Background: L'aderenza alla terapia antiretrovirale è particolarmente difficile nei bambini e negli adolescenti per diverse ragioni (poche formulazioni dei farmaci disponibili, scarsa palatabilità, scarsa consapevolezza dell'infezione, resistenza alla somministrazione da parte dei genitori/tutori). Le scarse conoscenze sulla cinetica dei farmaci nei primi anni di vita e le diverse caratteristiche metaboliche sono ulteriori fattori che rendono più difficile la somministrazione dell'ART nei bambini. L'interruzione programmata della terapia antiretrovirale nei bambini con controllo della replicazione virale e buoni Cd4, potrebbe essere una strategia capace di ridurre gli effetti collaterali e, per la presenza di un'attività timica, di produrre una buona risposta immunitaria anti HIV.

Metodi: Il Penta 11 è uno studio multicentrico internazionale, in aperto randomizzato e controllato di fase II. Obiettivi: valutare se interruzioni programmate (in base ai valori dei CD4) del trattamento (PTI) antiretrovirale possano costituire nei bambini una buona strategia per ridurre la tossicità della terapia senza provocare danni clinici, immunologici o virologici. Verranno arruolati 100 bambini con infezione cronica da HIV-1, tra i 2 ed i 15 anni, che assumono lo stesso regime terapeutico da almeno 6 mesi e che hanno una viremia inferiore a 50 copie e valori di CD4% superiori al 30% in almeno due distinte occasioni (con un numero totale di linfociti T>1000). I bambini arruolati verranno randomizzati 1:1 in due gruppi: Gruppo A continua la ART in corso Gruppo B Interruzione della terapia. I pazienti verranno stratificati in base all'età (>/<7 anni) e in base al nadir dei CD4 (>/<15%). Ad ogni visita il paziente verrà valutato da un punto di vista clinico e verranno eseguiti esami biochimici ed ematocimici, CD4 e viremia. I bambini che devono continuare la terapia verranno valutati ogni tre mesi come di routine. I pazienti in PTI verranno visti alle settimane 2, 4, 8, 12, quindi ogni 3 mesi. Il follow-up continuerà almeno finché l'ultimo bambino randomizzato non avrà completato la 72a settimana di follow-up. 40 bambini (20 per ciascun braccio) parteciperanno ad uno studio viro/immunologico con lo scopo di valutare le caratteristiche virologiche e immunologiche dopo l'interruzione della terapia. La durata della PTI sarà determinata dai livelli di CD4 e i pazienti in PTI ricominceranno il trattamento (il medesimo interrotto precedentemente) non appena i CD4 scenderanno <20%. Con i CD4>30% e la CV<50 copie/ml sarà possibile interrompere di nuovo la terapia. La terapia potrà essere reiniziata anche in presenza di progressione clinica della malattia, indipendentemente dal numero dei CD4. I bambini arruolati nel braccio B potranno cambiare terapia se si verificherà fallimento virologico o progressione clinica.

Risultati: Il protocollo è stato approvato dai comitati etici di 4 centri italiani. L'arruolamento è iniziato nel gennaio 2005 e al 28 febbraio 2005 sono stati arruolati 12 bambini, di cui 6 in Italia, 4 maschi e 2 femmine, di età compresa tra 5 e 15 anni.

Conclusioni: L'arruolamento va avanti e si ritiene di completare l'arruolamento entro 6 mesi. In Italia si prevede che verranno arruolati circa 30 bambini.

Contributo: 30F.24

MONITORAGGIO TERAPEUTICO DEI FARMACI (TDM) NEI BAMBINI CON INFEZIONE DA HIV CHE INIZIANO UNA NUOVA TERAPIA ANTIRETROVIRALE (STUDIO PENTA 14)

Osvalda Rampon* (*Dip. di Pediatria, Università degli Studi di Padova*); Federica Fregonese (*); Marisa Zanchetta** (*Istituto di Oncologia, Università degli Studi di Padova*); Martina Penazzato (*); Ruggiero D'Elia (*); Anita De Rossi (**); Mario Regazzi (*Università degli Studi di Pavia*); Carlo Giaquinto (*)

Background: Il Monitoraggio dei livelli plasmatici(TDM)dei PI e degli NNRTI è stato proposto come utile strumento per l'ottimizzazione dell'ART, fornendo per ogni paziente indicazioni per individualizzare il dosaggio dei farmaci al fine di ottenere la massima efficacia con la minima tossicità. Nel bambino le ragioni dei fallimenti terapeutici sono molteplici: comparsa di ceppi virali resistenti, scarsa aderenza alla terapia, mancato raggiungimento di livelli terapeutici adeguati in conseguenza dell'utilizzo dei farmaci a dosaggi non definiti in modo specifico per l'età pediatrica. Il razionale per l'utilizzo del TDM nei pazienti in terapia con PI o NNRTI sta nella possibilità di adattare i dosaggi individuali per ottimizzare la risposta terapeutica e contenere i già elevati costi assistenziali. Nei bambini questo è particolarmente importante in quanto il limitato numero di opzioni terapeutiche disponibili rende essenziale ottimizzare la terapia al fine di poterla mantenere il più a lungo possibile. Il maggior limite all'utilizzo del TDM in età pediatrica sta nella totale mancanza di valori di riferimento per le varie età, per cui non è possibile interpretare con sicurezza i risultati dei test effettuati.

Metodi: Il PENTA 14 è uno studio multicentrico internazionale di fase II randomizzato in aperto in bambini con infezione da HIV che devono iniziare o passare ad un nuovo regime terapeutico antiretrovirale, che includa un PI e/o un NNRTI. Obiettivi del Penta 14 sono la valutazione dell'efficacia del TDM sull'outcome virologico in bambini con infezione da HIV che iniziano o cambiano ART e la creazione di modelli di farmacocinetica in età pediatrica per l'interpretazione dei livelli plasmatici dei farmaci PI e NNRTI. Verranno arruolati 166 bambini HIV positivi (>1 mese e <18 anni) con HIV-1 RNA ≥ 1000 copie/ml e necessità di iniziare o passare ad una nuova terapia antiretrovirale. Lo studio prevede due parti in base all'uso di routine o meno del TDM.

Parte A (no TDM di routine): randomizzazione in: Maximal TDM v Minimal TDM v no TDM

Parte B (TDM di routine): randomizzazione in: Maximal TDM v Minimal TDM Nel gruppo "maximal TDM" il dosaggio di PI e/o di NNRTI verrà aggiustato in relazione ai risultati di una curva farmacocinetica completa, mentre nel gruppo "minimal TDM" il dosaggio verrà aggiustato annualmente sulla base delle analisi di un singolo livello plasmatico. Nel gruppo del "no TDM" i livelli plasmatici di PI/NNRTI saranno analizzati a posteriori. Il follow-up continuerà almeno finché l'ultimo bambino randomizzato non avrà completato la 96a settimana di follow-up. I bambini verranno visti alla settimana -2, 0, 4, 12 e quindi ogni 3 mesi, verranno sottoposti a visita clinica ed eseguiranno esami biochimici ed ematochimici, CD4 e viremia. Ad ogni controllo verrà utilizzato un kit specifico per migliorare l'aderenza e verrà somministrato un questionario per valutare la *compliance* alla terapia.

Risultati: Il protocollo è stato approvato dai comitati etici di 6 centri italiani. L'arruolamento è iniziato nel gennaio 2005 e al 28 febbraio 2005 sono stati arruolati 5 bambini, di cui 3 in Italia.

Conclusioni: L'arruolamento va avanti e si ritiene di completare l'arruolamento entro 8 mesi. In Italia si prevede che verranno arruolati circa 50 bambini.

Contributo: 30F.25

TERAPIA ANTIRETROVIRALE E LATTE MATERNO

Marina Giuliano* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Mauro Andreotti (*) ; Maria F. Pirillo (*) ; Gianni Guidotti (*) ; Mario Regazzi Bonora (*Università degli Studi di Pavia*); Giuseppe Liotta** (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Cristina Marazzi (*LUMSA*); Leonardo Palombi (**); Stefano Vella (*)

Background: La trasmissione del virus HIV attraverso l'allattamento ha un impatto rilevante nei paesi in via di sviluppo. Nei paesi industrializzati le attuali raccomandazioni per le donne HIV-positive prevedono di non allattare al seno e tale suggerimento ha di fatto abolito la trasmissione postnatale. Nei paesi in via di sviluppo l'allattamento materno presenta vantaggi dal punto di vista nutrizionale, immunologico, economico, logistico e socio-psicologico che condizionano fortemente la scelta della madre. È necessario pertanto mettere a punto delle strategie che consentano alle donne di allattare ma che allo stesso tempo non siano associate al rischio di trasmettere il virus HIV. Una delle strategie potrebbe essere quella di permettere alle donne di allattare in corso di terapia HAART. È necessario tuttavia avere delle informazioni preliminari sull'effetto della terapia antiretrovirale sul latte materno. È stato quindi disegnato uno studio pilota con l'obiettivo di confrontare la carica virale nel sangue e nel latte in donne in terapia antiretrovirale e in donne non trattate e di determinare le concentrazioni dei farmaci nel sangue e nel latte di donne in trattamento antiretrovirale.

Metodi: Sono state arruolate 80 donne HIV-positive in gravidanza. Nel gruppo A sono state arruolate 40 donne che avevano ricevuto un regime antiretrovirale di combinazione (ZDV o d4T + 3TC + NVP) dalla 28^a settimana di età gestazionale fino ad 1 mese postpartum per la prevenzione della trasmissione materno-infantile dell'HIV. Nel gruppo B sono state arruolate 40 donne che, essendo identificate come HIV-positive al momento del parto, non avevano ricevuto una profilassi con antiretrovirali. Tutti i bambini di queste donne hanno ricevuto una dose di nevirapina entro 72 dal parto. Al momento del parto sono stati ottenuti campioni di sangue per la conservazione del plasma e per la determinazione dei CD4+ e sono stati ottenuti prelievi di colostro/latte materno. Il 7° giorno postpartum sono stati nuovamente ottenuti campioni di sangue per la conservazione del plasma e campioni di latte materno.

Risultati: Lo studio è stato effettuato in Mozambico. Nel gruppo A dello studio sono state arruolate donne afferenti al programma DREAM della Comunità di S. Egidio presso il centro materno-infantile di Matola II a Maputo, mentre nel gruppo B sono state arruolate donne afferenti al centro materno-infantile di Mashava, alla periferia di Maputo. Presso quest'ultimo centro non viene routinariamente effettuato il test per l'HIV e non viene effettuata la prevenzione della trasmissione materno-infantile. È stata effettuata la raccolta di tutti i campioni dello studio. I campioni sono quindi stati trasferiti presso l'Istituto Superiore di Sanità dove sono in corso le analisi virologiche. Successivamente verranno determinate le concentrazioni dei farmaci antiretrovirali nel plasma e nel latte materno.

Conclusioni: Se i risultati di questo studio confermeranno che la terapia antiretrovirale è in grado di diminuire la carica virale nel latte a livelli non determinabili e che le concentrazioni dei farmaci nel latte sono relativamente basse, verrà avvalorata l'ipotesi che l'allattamento materno in corso di terapia HAART ha un basso rischio di trasmissione del virus HIV e non è associato ad effetti collaterali nel bambino. Potrà quindi essere disegnato uno studio randomizzato che confronti la trasmissione verticale in donne che allattano in corso di trattamento antiretrovirale e in donne che effettuano l'allattamento artificiale.

Contributo: 30F/H

UNO STUDIO CLINICO CONTROLLATO PER LA VALUTAZIONE DI 2 REGIMI ANTIRETROVIRALI SEMPLIFICATI, UNO SENZA INIBITORI DELLA PROTEASI E UNO SENZA ANALOGHI NUCLEOSIDICI, IN PAZIENTI IN FASE AVANZATA DI MALATTIA CHE HANNO RISPOSTO AD UNA PRECEDENTE TERAPIA DI COMBINAZIONE CON 3 O 4 FARMACI

M. Giuliano* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); L. Weimer (*); M. F. Pirillo (*); E. A. P. Germinario (*); A. Mattei (*)

Background: La complessità dei regimi antiretrovirali può essere responsabile di un aumento della tossicità e di un aumentato tasso di fallimenti virologici in relazione alla diminuita *compliance*. Lo studio A5116 ha valutato la sicurezza e l'efficacia di 2 regimi semplificati che risparmiano una classe di farmaci (uno senza inibitori della proteasi e uno senza analoghi nucleosidici) in pazienti con soppressione della replicazione virale di lunga durata. Lo studio è stato effettuato in collaborazione con la Division of AIDS dei National Institutes of Health degli USA e si è svolto contemporaneamente in centri clinici italiani e statunitensi.

Metodi: L'A5116 è un trial randomizzato che ha confrontato un regime con lopinavir/ritonavir (533mg/133mg x 2) + Efavirenz (EFV) 600 mg e un regime con 2 analoghi nucleosidici (a scelta dello sperimentatore) + EFV 600 mg in pazienti precedentemente trattati per almeno 18 mesi con un regime con 3 o 4 farmaci (con inibitori della proteasi o con inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa), con un livello di HIV-RNA < 200 copie/ml e senza resistenza fenotipica documentata. L'endpoint primario era rappresentato dal tempo fino al fallimento virologico confermato o fino all'interruzione, causata da tossicità, di uno qualsiasi dei componenti del regime iniziale nei due bracci di trattamento.

Risultati: Sono stati arruolati 236 pazienti (118 per braccio) di cui 27 nei 7 centri clinici italiani partecipanti. I pazienti sono stati seguiti per un tempo mediano di 110 settimane. Nel braccio 2 NRTIs + EFV, il 78% dei pazienti riceveva zidovudina e lamivudina e il 19% stavudina e lamivudina. L'età mediana era di 43 anni, l'87% dei pazienti erano uomini, la mediana dei CD4+ al baseline era di 475 cellule/mm³. Complessivamente 16 (7%) pazienti hanno avuto un fallimento virologico e 25 (11%) hanno interrotto il trattamento per tossicità. Il tempo fino all'endpoint primario è stato più lungo nel braccio EFV + 2 NRTIs (p=0.001). Il tasso di fallimenti virologici nel braccio LPV/r + EFV è stato più alto sebbene la differenza non sia statisticamente significativa (p=0.088). Le interruzioni per tossicità si sono verificate più frequentemente nel braccio LPV/r + EFV (p=0.002) e sono state legate principalmente a differenze nei livelli di trigliceridi. Nel braccio LPV/r + EFV sono stati osservati livelli più elevati di trigliceridi e colesterolo, mentre non sono stati osservati effetti sul glucosio o sull'insulina.

Conclusioni: Il passaggio ad un regime con EFV + 2 NRTIs è stato associato ad un più basso tasso di fallimenti terapeutici rispetto al regime con LPV/r + EFV in pazienti in soppressione della replicazione virale di lunga durata con un precedente regime più complesso. Il trattamento con LPV/r + EFV è risultato associato ad aumenti significativi nei lipidi, specialmente trigliceridi. Sebbene la maggior parte dei pazienti abbia mantenuto la soppressione della replicazione virale, è stato osservato un trend non significativo di aumentato fallimento virologico con il regime di LPV/r + EFV in questa popolazione.

Centri partecipanti: Prof. Giampietro Cadeo, Spedali Civili di Brescia; Prof. Giampiero Carosi, Università di Brescia; Prof. Roberto Esposito, Università di Modena; Prof. Francesco Mazzotta, Ospedale S. M. Annunziata, Firenze; Prof. Francesco Meneghetti, Azienda Ospedaliera di Padova; Prof. Gian Marco Vigevani, Ospedale L. Sacco, Milano; Prof. Vincenzo Vullo, Università di Roma.

Contributo: 30F/G

RUOLO DELLA TERAPIA ADIUVANTE CON IL-2 NELL'INTERRUZIONE STRUTTURATA DELLA TERAPIA (STI) ANTIRETROVIRALE IN PAZIENTI CON INFEZIONE PRIMARIA DA HIV-1

Giulia Marchetti* (*Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi di Milano*); Miriam Cesari (*); Daria Trabattoni** (*Dip. di Immunologia, Università degli Studi di Milano*); Monica Schenal (**); Luca Meroni (*); Mauro Moroni (*); Massimo Galli (*); Fabio Franzetti (*); Mario Clerici (**); Andrea Gori (*)

Background: Il razionale di un approccio di interruzione strutturata di terapia (STI) in pazienti HIV+ trattati con HAART durante l'infezione primaria (PHI) si basa sulla possibilità di elicitare una efficace risposta immune HIV-specifica. IL-2 potrebbe reindirizzare, potenziandola, la risposta immune, tramite la modificazione dell'assetto immunologico e la selettiva espansione di cloni HIV-specifici.

Metodi: 7 pazienti trattati con HAART durante PHI per almeno 3 anni (ELISA al cut-off, <3 bande al Western Blot, HIV-DNA positivo) sono stati sottoposti a 3 cicli di sospensione di 21 giorni intervallati da 21 giorni di HAART, associata nei primi 5 giorni ad IL-2 (4.5 x 10⁶ UI sc 2 volte al giorno). All'ultimo ciclo di IL-2, la HAART è stata mantenuta sospesa e reintrodotta secondo le linee guida internazionali. Sono stati misurati i livelli periferici di CD4+, CD8+, HIV-RNA, attività HIV-specifica, i pattern di maturazione T-linfocitaria per 12 mesi.

Risultati: All'arruolamento (T0) i valori mediani di CD4+ ed HIV-RNA erano 698/ml e <50 cp/ml. IL-2 è stata ben tollerata, senza eventi avversi severi. I valori di HIV-RNA hanno mostrato assai modesti incrementi durante i cicli di STI/IL-2, mantenendosi al di sotto di 5000 cp/ml in tutti i pazienti sino a 7 mesi dalla sospensione definitiva della HAART, con un progressivo incremento fino ad un valore mediano di 32000 cp/ml a 12 mesi. Durante lo studio si è osservato un incremento dei CD4+ con picchi consensuali ad ogni singolo ciclo di IL-2, con un aumento significativo al termine dei 3 cicli (T9=1146/ml; p<0.05). Dopo la sospensione finale della HAART i CD4+ hanno subito un progressivo declino, tuttavia significativamente superiori ai livelli del T0 fino all'8° mese (T8m=721/ml; p<0.05). Durante i cicli di STI/IL-2 i CD8+ hanno subito incrementi transitori ma mai significativi; dal momento della sospensione definitiva si è osservata una tendenza verso un costante incremento consensuale alla viremia (T0=731/ml; T9=972/ml; T8m=1211/ml; p>0.05). La caratterizzazione fenotipica ha evidenziato l'espansione dei CD8+ naive e central memory durante i cicli di STI/IL-2, senza alcuna modificazione dei CD8+ effector memory. Diversamente, l'incremento della viremia alla sospensione della HAART si è associata ad un significativo, ancorché non sostenuto nel tempo incremento dei CD8+ terminally differentiated e central memory. Da un punto di vista funzionale, si è assistito ad una tendenza all'incremento della risposta mediana CD4+ HIV-specifica, senza nessuna differenza significativa nella risposta CD8+.

Conclusioni: IL-2 in corso di STI in pazienti trattati durante PHI si è mostrata sicura e ben tollerata, associata al controllo della viremia plasmatica ed all'incremento dei CD4+ sino ad 8 mesi di sospensione della HAART. L'aumento delle risposte HIV-specifiche suggerisce che la somministrazione di IL-2 è in grado di mantenere ed amplificare una risposta CD4+ HIV-specifica, non associata ad attività citotossica CD8+-mediata. IL-2 determina l'espansione del pool CD8+ naive e central memory, mentre il rebound virale alla sospensione si associa al ripristino di un aberrante quadro maturativo CD8+, prevalentemente terminally differentiated.

Contributo: 30F.26

PREPARAZIONE E STUDIO DI STABILITÀ NEGLI ERITROCITI DI UN ETRODINUCLEOTIDE DI LAMIVUDINA E TENOFOVIR UTILE PER L'INIBIZIONE DELLA REPLICAZIONE DI HIV NEI MACROFAGI

Palmarisa Fianchetti* (*Università degli Studi di Camerino*); Loredana Cappellacci (*); Michela Pasqualini (*); Luigia Rossi** (*Università degli Studi di Urbino*); Sonia Serafini (**); Mauro Magnani (**); Mario Grifantini (*)

Background: La terapia anti-HIV basata sulla combinazione dei farmaci attualmente disponibili non è in grado di eradicare il virus nei soggetti infetti a causa dell'esistenza di reservoirs del virus refrattari al trattamento terapeutico. I macrofagi derivati dai monociti (M/M) sono considerati importanti reservoirs *in vivo* per differenti tipi di virus incluso l'HIV. Pertanto, la possibilità di inibire la replicazione di HIV negli M/M rappresenta una strategia terapeutica attraente. La ricerca è finalizzata allo studio dell'eterodinucleotide 3TCpPMPA, un doppio farmaco costituito dagli agenti anti-HIV e anti-HBV Lamivudina (3TC, Epivir) e Tenofovir (PMPA) uniti tramite un ponte fosfato, preparato allo scopo di ottenere un profarmaco potenzialmente in grado di liberare i due farmaci nella forma monofosforilata nelle cellule bersaglio se veicolato selettivamente tramite gli eritrociti.

Metodi: 3TCpPMPA è stato ottenuto per condensazione chimica del sale di tributilammonio di 3TCMP con la PMPA attivata come derivato morfolidato. La struttura dell'eterodinucleotide purificato è stata determinata mediante spettroscopia NMR e di Massa. Il farmaco è stato sottoposto a studi di stabilità in diverse condizioni. Dell'eterodinucleotide è stato valutato il metabolismo in lisati eritrocitari in assenza e in presenza di ATP ed i metaboliti sono stati determinati tramite HPLC. Inoltre, si è proceduto al caricamento del farmaco in eritrociti umani (RBC) tramite una procedura di dialisi ipotonica e risigillamento isotonic.

Risultati: 3TCpPMPA incubato in lisati eritrocitari risulta essere lentamente convertito in PMPA e 3TCMP, il quale viene successivamente defosforilato a 3TC. Dopo 24 ore in presenza di ATP il 63% dell'eterodinucleotide rimane inalterato, risultando così sufficientemente stabile per consentire l'impiego degli eritrociti per il targeting macrofagico. In studi preliminari è stato possibile incapsulare il farmaco negli eritrociti umani fino ad una concentrazione di 0.24 μmol di 3TCpPMPA/ml RBC.

Conclusioni: I dati sperimentali ottenuti hanno dimostrato che l'eterodinucleotide 3TCpPMPA, se incapsulato in eritrociti autologhi modificati al fine di incrementare il riconoscimento e fagocitosi da parte dei macrofagi umani, è sufficientemente stabile da permettere l'impiego degli eritrociti caricati con il farmaco come sistema di veicolazione selettiva di PMPA e di 3TC nella forma monofosforilata nel comparto macrofagico. Sono in corso esperimenti volti ad ottimizzare la procedura di loading del farmaco. Gli eritrociti con il farmaco incapsulato saranno, quindi, somministrati a macrofagi umani e sarà valutata la loro efficacia nella protezione di tale comparto cellulare da infezioni "de novo" da HIV-1.

Contributo: 30F.27

TRIPLICE COMBINAZIONE ANTIRETROVIRALE ASSOCIATA A IL-2 STUDIO PILOTA RANDOMIZZATO DI FASE II

Silvia Nozza* (*IRCCS San Raffaele, Milano*); Giuseppe Tambussi (*); Adriano Lazzarin (*Università Vita-Salute, Milano*)

Background: Il fallimento terapeutico è un importante aspetto del trattamento dell'infezione da HIV e la sua frequenza sta aumentando; occorre quindi cercare nuove forme terapeutiche che prevedono l'associazione di farmaci antivirali con sostanze che determinino un potenziamento del sistema immunitario, quali ad esempio interleukina-2 (IL-2). L'obiettivo di questo studio è valutare l'effetto di IL-2 in soggetti HIV+ con conta delle cellule CD4+ inferiore a 200 cellule/mmc e HIV-RNA persistentemente determinabile nonostante il trattamento con HAART, al fine di comprendere come e se questa strategia possa essere utile nella gestione del paziente. In linea con la tempistica delineata nel progetto, al gennaio 2005 sono stati ottenuti seguenti risultati. Finalizzazione del protocollo clinico e approvazione del protocollo clinico da parte del comitato etico dell'IRCCS San Raffaele, Milano. Contemporaneamente si è provveduto alla preparazione del data base clinico per la successiva elaborazione dei dati. È attualmente in corso il pre-screening dei pazienti afferenti alla Clinica delle Malattie Infettive IRCCS San Raffaele, Milano: utilizzando il data base della clinica, sono stati individuati i soggetti potenzialmente includibili nello studio. Al momento, 64 pazienti HIV+ con CD4+ superiori a 50/mmc, con HIV-RNA determinabile malgrado una HAART potenzialmente attiva. Una volta stabilita la loro eleggibilità, saranno randomizzati in uno dei seguenti gruppi: Gruppo A: trattamento con IL-2 alla dose di 4,5 MIU s.c. due volte al giorno per 5 giorni ogni 8 settimane per 6 cicli aggiunta alla terapia antiretrovirale. Gruppo B: controllo (solo terapia antiretrovirale). La randomizzazione ha rapporto di 1:1 (IL-2 e HAART verso HAART sola). Lo studio è aperto e la randomizzazione è stratificata a seconda della conta dei CD4+ (50-199 cellule/mmc e >200 cellule/mmc). Principali criteri di inclusione:

1) terapia antiretrovirale stabile da almeno due mesi; 2) CD4, entro due mesi prima della randomizzazione, >50/mmc. Principali criteri di esclusione: 1) patologia acuta HIV-correlata non controllata; 2) patologie clinicamente rilevanti cardiache, polmonari, tiroidee, renali, neurologiche, disturbi dell'emostasi; 3) gravidanza o allattamento. Propedeutico all'inizio dello studio è l'esecuzione dei test geno/fenotipici per la definizione del quadro di resistenza farmacologica. La contemporanea attivazione delle procedure di stoccaggio del materiale biologico, consentirà di avere a disposizione adeguate quantità di campioni per le analisi da effettuarsi negli anni di studio successivi. In particolare, verranno caratterizzati fenotipicamente gli isolati primari, con l'obiettivo di verificare capacità da parte di IL-2 di influenzare l'utilizzo dei corecettori virali (CCR1, CCR2b, CCR3, CCR5 e CXCR4).

Contributo: 30F.28

PRESENTAZIONE CLINICA E GESTIONE TERAPEUTICA DELL'HIV/AIDS NELL'ANZIANO: STUDIO MULTICENTRICO NAZIONALE APA (AIDS NEL PAZIENTE ANZIANO)

Giuseppina Liuzzi* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Lucia Fratino (*); Dora Larussa (*); Maria Paola Trotta (*); Letizia Giancola (*); Pietro Balestra (*); Valerio Tozzi (*); Mauro Zaccarelli (*); Pietro Sette (*); Francesco Baldini (*); Fabio Soldani (*); Patrizia Marconi (*); Rosa Acinapura (*); Andrea Antinori (*)

Background: Gli adulti con età avanzata costituiscono una parte sempre più consistente della popolazione affetta dal virus HIV. Si assiste infatti ad un lento ma progressivo incremento dell'età media dei pazienti HIV+, dovuto a molteplici variabili tra cui la diagnosi tardiva in persone non ritenute "a rischio", l'evoluzione farmacologica ed i notevoli progressi realizzati nell'ambito della terapia antiretrovirale.

Metodi: Costituzione di una coorte multicentrica italiana di soggetti con infezione da HIV con età >50 anni - Individuazione di uno strumento per la valutazione: a) dello stato funzionale del paziente anziano con HIV; b) del tipo e grado di patologie croniche associate; c) dell'aderenza alle terapie antiretrovirali e della qualità della vita; c) dei disturbi cognitivi che possono essere presenti nel paziente anziano HIV+.

Risultati: Dati del nostro gruppo di ricerca provenienti da una coorte di 1147 pazienti neurologici HIV+ hanno evidenziato che i soggetti con patologia neurologica di età >50 anni sono più frequentemente naive alla terapia antiretrovirale, di sesso maschile, con una trasmissione della malattia da HIV prevalentemente per via sessuale, con una storia di malattia più breve e presentano più frequentemente sintomi cognitivi e atrofia cerebrale. Durante il follow-up è emerso nel gruppo dei pazienti anziani un maggior numero di cambi o interruzioni della terapia antiretrovirale per tossicità. Nello studio dei fattori predittivi di sopravvivenza si è osservato che l'età non sembra avere un impatto significativo. Dal 2003 ad oggi sono stati effettuati presso la nostra Struttura 260 esami neuropsicologici 43 dei quali a pazienti HIV+ con età >50 anni, di questi 22 presentavano un esame neuropsicologico alterato, e 21 un esame neuropsicologico patologico. Nei primi mesi di attività del progetto è stata messa a punto una scheda di valutazione complessiva del paziente anziano HIV+ comprendente: a) stato di malattia HIV b) terapia antiretrovirale, c) presenza di sintomi riportati dal paziente, d) stato funzionale, e) comorbidità, f) terapie concomitanti. In particolare lo stato funzionale del paziente sarà valutato con la scala IADL e per lo studio della comorbidità verrà utilizzata la scala di valutazione CIRS-G. È stato messo a punto un questionario auto-compilato dal paziente per la rilevazione dell'aderenza alla terapia antiretrovirale specifico per la popolazione di pazienti anziani. Tale questionario indaga il livello di aderenza alla terapia antiretrovirale, eventuali comportamenti di non-aderenza, le principali motivazioni di non-aderenza e il livello di consapevolezza circa l'efficacia della propria terapia. Sono state incluse una scala di valutazione per la qualità di vita, la valutazione della presenza di disturbi di tipo depressivo e una sezione per la valutazione dei disturbi cognitivi minori.

Conclusioni: Una valutazione multidimensionale ed il piano di intervento che da essa deriva potrebbe consentire una maggiore accuratezza nella diagnosi, una migliore programmazione del trattamento, una migliore scelta di collocamento del paziente anziano HIV+ con una riduzione del grado di ospedalizzazione e un incremento della sopravvivenza.

Contributo: 30F.29

STUDIO DEL COMPARTIMENTO GENITALE MASCHILE QUALE RESERVOIR NELLE VARIE FASI DI INFEZIONE DA HIV-1: ANALISI DELL'EFFICACIA DI NUOVI FARMACI ANTIRETROVIRALI E DI NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE

Giuseppina Liuzzi* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Roberta D'Arrigo (*); Mauro Zaccarelli (*); Alessandra Amendola (*); Valerio Tozzi (*); Rita Bellagamba (*); Fabio Continenza (*); Patrizia Marconi (*); Rosa Acinapura (*); Ubaldo Visco Comandini (*); Carlo Federico Perno (*); Andrea Antinori (*)

Background: Il sequestro dell'infezione da HIV-1 nei reservoirs anatomici quale il compartimento genitale rappresenta al momento il principale ostacolo alla eradicazione dell'infezione e costituisce uno degli elementi patogenetici del fallimento virologico alle terapie antiretrovirali potenti. Sono ormai numerose le dimostrazioni che suggeriscono come un controllo inefficace della replicazione virale nei compartimenti possa favorire lo sviluppo di ceppi resistenti e conseguentemente aumentare la chance di fallimento virologico con possibile trasmissione di ceppi virali resistenti.

Metodi: 1) Studio delle modificazioni della carica virale indotte dalle diverse combinazioni di farmaci antiretrovirali nel sangue e nello sperma di soggetti anti-HIV+ trattati 2) Analisi, nel plasma e nello sperma, di mutazioni genotipiche conferenti resistenza a nuove classi di farmaci antiretrovirali. 3) Studio della cinetica di HIV nel liquido seminale dopo introduzione di una nuova terapia genotipo-guidata; 4) Identificazione di un caso di trasmissione sessuale di HIV-1 multiresistente.

Risultati: 1-2) Sono state analizzate le modificazioni della carica virale di HIV-1 nel sangue e nello sperma durante il fallimento della terapia antiretrovirale con enfuvirtide in 2 pazienti HIV+. Il primo paziente, con carica virale basale plasmatica di 33,188 copie/ml, seminale di 728 copie/ml e 26 CD4, non presentava mutazioni associate a resistenza ad enfuvirtide né nel plasma né nel liquido seminale. Dopo 32 settimane di terapia è stato rilevato un miglioramento della situazione viroimmunologica, nel plasma non si rilevava nessuna mutazione associata a resistenza ad enfuvirtide, mentre erano presenti altre due mutazioni: la Q45 H e la L45M, ritrovate anche nel liquido seminale. Il secondo soggetto presentava una carica virale plasmatica basale di 132,983 copie e 16 CD4 e una carica virale nel liquido seminale di 4725 copie/ml; a 36 settimane di follow-up, al miglioramento della condizione viroimmunologica sia nel plasma che nel liquido seminale, si evidenziava la presenza della mutazione G36V nel plasma e anche della V38E nel liquido seminale. 3) È stata valutata la cinetica di decadimento dell'HIV RNA plasmatico e seminale nelle prime fasi di una nuova terapia genotipo-guidata in 6 pazienti HIV+i in fallimento virologico. È stato osservato un comportamento differente della viremia seminale rispetto a quella plasmatica nella maggior parte dei pazienti considerati. 4) È stato documentato un caso di trasmissione sessuale di un ceppo virale di HIV multiresistente mediante lo studio del plasma e del liquido seminale dei soggetti coinvolti. In particolare è stato osservato che le mutazioni presenti nel sangue del soggetto infettato erano quelle presenti nel liquido seminale del soggetto infettante.

Conclusioni: Abbiamo per la prima volta dimostrato che è possibile identificare anche nel liquido seminale mutazioni nella regione 36-45 della gp41. Ciò rappresenta un'ulteriore conferma alla necessità di identificare un trattamento antiretrovirale efficace che, riducendo marcatamente l'HIV-RNA nello sperma, possa svolgere un ruolo fondamentale nella prevenzione della trasmissione sessuale dell'HIV.

Contributo: 30F.30

STUDI DI TOSSICITÀ ED EFFICACIA DI ERITROCITI CARICATI CON FLUDARABINA IN SOOTY MANGABEYS INFETTATI CON SIV

Sonja Serafini* (*Università degli Studi di Urbino*); Barbara Cervasi (*); Mirko Paiardini (*); Alessandra Fraternali (*); Guido Silvestri (*Emory University, Atlanta, GA, USA*); Mauro Magnani (*)

Background: L'attuale terapia antiretrovirale (HAART) è in grado di ridurre drasticamente la replicazione di HIV che avviene maggiormente ad opera delle cellule T CD4⁺, tuttavia non porta all'eradicazione dell'infezione per la presenza sia di linfociti T CD4⁺ latentemente infettati che di macrofagi cronicamente infettati. Quindi nuovi approcci atti ad intervenire direttamente sulla replicazione o sull'eradicazione di HIV nei macrofagi possono rappresentare un obiettivo terapeutico importante. A tal fine ci siamo proposti di valutare gli effetti sul modello costituito da scimmie Sooty Mangabeys infettate con SIV di una nuova strategia terapeutica basata sulla somministrazione di eritrociti (RBC) autologhi contenenti l'analogo nucleosidico Fludarabina (Flu) da indirizzare selettivamente ai macrofagi infettati. Il nostro studio era suddiviso in 2 parti: a) valutazione della safety e dell'efficacia terapeutica della somministrazione di RBC caricati con Flu; b) valutazione dell'efficacia terapeutica dello stesso trattamento in combinazione con un potente antivirale (PMPA).

Metodi: Nella prima parte dell'esperimento (a) 2 scimmie infettate e 1 non infettata sono state trattate con infusioni di RBC autologhi contenenti Flu a distanza di 7 giorni una dall'altra per un totale di 28 giorni e di 4 infusioni. Nella seconda parte dell'esperimento (b) 2 scimmie infettate erano trattate con PMPA alla dose di 30 mg/Kg i.m. per un totale di 28 giorni, altre 2 scimmie infettate erano trattate con la combinazione di PMPA e di Flu incapsulata negli RBC (4 infusioni a distanza di 7 giorni una dall'altra). Per la valutazione dell'efficacia terapeutica sono stati studiati: viremia plasmatica, espressione virale nei linfonodi, immunofenotipo su sangue periferico, su midollo e su linfonodi. La Flu è stata incapsulata negli RBC tramite una procedura di dialisi ipotonica e risigillamento isotonic, quindi gli RBC caricati con il farmaco sono stati processati per favorire il loro riconoscimento da parte dei macrofagi.

Risultati: La Flu è stata incapsulata all'interno degli RBC ad una concentrazione compresa nel range tra 1.4±0.9 e 2.5±1.4 μmoli/ml RBC (considerando non solo Flu ma anche tutti i suoi derivati fosforilati). In media gli animali ricevevano 130 e 176 μg di Flu per infusione, per la parte (a) e (b) rispettivamente. La valutazione dei parametri ematologici, dello stato di salute generale e l'osservazione del comportamento degli animali trattati hanno rivelato una assoluta assenza di tossicità degli RBC Flu-loaded. I dati sulla viremia plasmatica e l'immunofenotipo su sangue periferico riguardanti la parte (a) mostrano che tutti gli animali trattati hanno un aumento della percentuale delle cellule T CD4⁺ proliferanti (Ki67⁺) ma non un aumento della carica virale in circolo. L'unico risultato fino ad ora disponibile riguardante la parte (b) ottenuto dalla valutazione della viremia plasmatica mostra che tutti e 4 gli animali, dopo un brusco calo della viremia subito dopo l'inizio dei trattamenti che permane per tutta la durata della somministrazione di PMPA (28 giorni), subiscono un aumento che comunque risulta di minore entità nelle scimmie trattate con la combinazione. Ciò suggerisce che un breve trattamento con RBC caricati con Flu (4 infusioni) è tuttavia sufficiente per ridurre il pool dei reservoirs di origine macrofagica.

Conclusioni: I risultati ottenuti da questo studio mostrano la possibilità di utilizzare gli RBC caricati con Flu al fine di eliminare selettivamente i reservoirs di origine macrofagica da combinare eventualmente con i farmaci tradizionali della HAART.

Contributo: 30F.31

RUOLO DI UCP NELL'ATTIVITÀ MITOCONDRIOTROPICA DEGLI INIBITORI DELLE PROTEASI

Barbara Ascione* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Elisabetta Mormone (*); Antonella Tinari (*); Barbara Lucia** (*Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Roberto Cauda (**); Paola Matarrese (*); Walter Malorni (*)

Background: Gli Inibitori delle Proteasi (IP) di HIV si sono dimostrati in grado di bloccare l'apoptosi e di determinare immunoriconoscimento. Sebbene sia stata ipotizzata un'azione degli IP a livello mitocondriale, il meccanismo attraverso cui agiscono non è stato ancora chiarito del tutto (Matarrese *et al.* 2003). L'importanza della comprensione di questo meccanismo è particolarmente importante in considerazione degli effetti collaterali della HAART (dislipidemia, lipodistrofia, insulino resistenza etc.).

Metodi: In questo studio condotto *ex vivo* su linfociti umani isolati da soggetti sani e da pazienti HIV+, sono stati considerati i seguenti IP: indinavir, saquinavir, lopinavir e ritonavir. Citofluorimetria: per l'analisi dei recettori di superficie mediante l'impiego di anticorpi monoclonali, per la valutazione quantitativa dell'apoptosi, per l'analisi del potenziale di membrana mitocondriale mediante probe specifici, per la valutazione semiquantitativa della produzione di specie reattive dell'ossigeno, del potenziale redox intracellulare e dell'espressione di proteine intracitoplasmatiche; Biochimica: western blotting per la quantificazione dell'espressione delle UCPs, e tecniche specifiche di frazionamento cellulare.

Risultati: 1. gp120 agisce da pro-ossidante ed il pre-trattamento delle cellule T con IP protegge dal disequilibrio redox. In particolare, anione superossido e perossinitriti sono aumentati a seguito di esposizione a gp120 e gli IP agiscono de facto come antiossidanti. Inoltre, il trattamento dei linfociti T con gp120 induce, come evento precoce, un aumento delle cellule con mitocondri iperpolarizzati, cioè con aumentato potenziale di membrana (MMP). La somministrazione di IP comportava un blocco nell'aumento del MMP e la conseguente riduzione dell'apoptosi. Questi dati confermano che gli IP agiscono specificamente come radical scavengers. 2. Ad agire analogamente ad IP sono gli agenti mitocondriotropici ad attività disaccoppiante. Ad esempio, il trattamento dei linfociti T con il fattore FCCP, a dosi estremamente basse e non citotossiche, inibiva l'aumento dell'MMP e la produzione delle specie reattive dell'ossigeno determinata da gp120, prevenendo l'apoptosi (Matarrese *et al.* Cell Death & Diff, in press). Ulteriori esperimenti hanno messo in evidenza che in cellule T il trattamento con IP determinava una significativa riduzione delle proteine disaccoppianti endogene (review: Krauss K. *et al.*, 2005). Il ruolo di queste proteine mitocondriali è di agire come proton leakers e modulare la produzione di radicali e l'apoptosi. Questo effetto target degli IP è stato confermato da esperimenti su mitocondri isolati (Matarrese *et al.* submitted to AVT).

Conclusioni: Alla luce di questi dati si può ipotizzare che gli IP contribuendo al mantenimento dell'omeostasi mitocondriale e all'equilibrio redox, potrebbero svolgere un'azione *encoupler-like*, riducendo l'iperpolarizzazione mitocondriale desensibilizzando le cellule T periferiche ad apoptosi (ad esempio sensibilizzate da gp120). Il meccanismo tramite cui agiscono sembra coinvolgere un target specifico intramitocondriale: le proteine disaccoppianti endogene (UCPs). In considerazione dell'importanza di UCPs nella dislipidemia e nell'insorgenza di diabete tipo 2 (Krauss *et al.* 2005), i nostri risultati assumono una importante valenza clinica e propongono le UCPs come possibili marcatori prognostici di riferimento (studio in corso; Lucia *et al.* J AIDS in press). Gli IP vanno quindi considerati come agenti mitocondriotropici annoverabili nel contesto della cosiddetta medicina mitocondriale.

Contributo: 30F/I

MODIFICAZIONI DELL'ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI CON L'APOPTOSI DURANTE LA TERAPIA IN PAZIENTI HIV: NUOVE INFORMAZIONI DA UN SAGGIO DI RNA PROTECTION

Emanuela Balestrieri* (*Dip. di Neuroscienze, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Sandro Grelli** (*Dip. di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche., Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Claudia Matteucci (**); Antonella Minutolo (**); Gabriella D'Ettore*** (*Dip. di Malattie Infettive e Tropicali, Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Filippo Lauria^o (*Unità di Immunologia Clinica, Ospedale S. Giovanni, Roma*); Francesco Montella (°); Vincenzo Vullo (**); Stefano Vella (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Beatrice Macchi (*); Antonio Mastino (*Dip. di Scienze Microbiologiche, Gen. e Mol., Università degli Studi di Messina*)

Background: Sulla base di quanto da noi già descritto sulle modificazioni dei livelli di apoptosi spontanea dei linfociti di pazienti HIV+ naive immessi in terapia, abbiamo utilizzato la stessa strategia di indagine longitudinale per ottenere ulteriori informazioni, a livello di espressione genica, sui meccanismi che regolano le capacità di HIV di determinare morte/sopravvivenza dei linfociti, nel corso della terapia. Ciò per consentire anche un impiego più razionale di un'eventuale terapia di immunoricostruzione.

Metodi: È stata utilizzata la metodica di "RNA-protection-assay", su campioni di sangue periferico ottenuti da 12 pazienti HIV+ informati e consenzienti. I pazienti sono stati controllati prima dell'ingresso in terapia (tempo 0) e a 3, 6 mesi e 1 anno. Oltre all'analisi quantitativa dell'espressione genica per un pannello comprendente 19 geni, sono stati valutati i parametri virologici e immunologici, e determinato il livello di apoptosi. I risultati sono stati posti tra loro in relazione e valutati mediante analisi statistica.

Risultati: Per l'espressione di geni per cui esistevano già dei chiari riferimenti da precedenti studi eseguiti sui pazienti in terapia (caspasi 8, fas, fasL bcl-2), è stato possibile confermare la rispondenza tra quanto già osservato. Anche per quanto riguarda i geni tnfr1, bcl-xL e trail, per cui i dati riportati in letteratura erano meno chiari e comunque non relativi a studi longitudinali in corso di terapia, i risultati sono compatibili con quanto atteso (espressione di tnfr1 e trail a diminuire nel tempo, anche se ai 3 mesi tnfr1 mostra addirittura un aumento rispetto al tempo 0, espressione del gene bcl-xL ad aumentare). Per quanto riguarda geni pro-apoptotici connessi con la via dei recettori di morte quali fadd, fafl, tradd, dr3 o il gene bax per cui non esistevano dati da pazienti in terapia, la loro espressione va a decrescere con il procedere della terapia, mentre l'espressione del gene della proteina antiapoptotica Mcl-1 va ad aumentare. L'analisi ha infine mostrato un gruppo di geni (p53, p21, gadd, c-fos, rip e fap) la cui espressione non è risultata essere modificata in corso di terapia. Per alcuni di essi, quali p53 e p21, questi risultati sono in contrasto con dati ottenuti da altri gruppi e sarà quindi interessante definire quanto tali geni siano effettivamente legati alla genesi del fenomeno di apoptosi prematura dei linfociti innescato dall'infezione da HIV *in vivo* e nei meccanismi di immunorestituzione determinati dalla terapia antiretrovirale.

Conclusioni: Il quadro complessivo che emerge è quello che le modificazioni nei livelli di morte prematura dei linfociti che osservano in conseguenza della progressione della malattia e poi, in direzione opposta, in conseguenza della caduta della carica virale successiva alla risposta alla terapia, siano il risultato di una complessa, ma logica e coerente, rete di segnali che regolano in modo multifattoriale la morte/sopravvivenza dei linfociti durante l'infezione da HIV.

Contributo: 30F.32

INTERLEUCHINA-15 E CELLULE NK: EFFETTO FUNZIONALE SULLA PRODUZIONE DI IFN-GAMMA, BETA-CHEMOCINE E ATTIVITÀ CITOTOSSICA

Gabriella D'Ettore* (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Mauro Andreotti (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Martina Carnevalini (*); Carolina Andreoni (*); Lorenzo Zaffiri (*); Giancarlo Ceccarelli (*); Vincenzo Vullo (*); Claudio M. Mastroianni (*)

Background: In questi ultimi anni l'attenzione dei vari ricercatori si è focalizzata sull'impiego di strategie immunoterapeutiche, basate sull'uso di citochine, come IL-2, volte all'incremento e/o al recupero delle risposte funzionali cellulo-mediate durante l'infezione da HIV. Recenti linee di ricerca hanno documentato come IL-15, una citochina Th1 prodotta dalle cellule dendritiche e dai monociti/macrofagi nelle fasi iniziali della risposta immune, abbia acquisito una crescente rilevanza biologica nell'infezione da HIV. L'interesse sul possibile impiego clinico di tale citochina quale agente immunoterapeutico nell'infezione da HIV deriva dalle possibilità di IL-15 di indurre una potente stimolazione delle cellule del sistema immune innato e acquisito. È stato dimostrato che IL-15 ha un importante ruolo nello sviluppo, sopravvivenza e funzione delle cellule NK. Abbiamo valutato l'effetto funzionale di IL-15 sulle cellule NK nei pazienti con infezione da HIV, con e senza terapia HAART.

Metodi: È stato studiato l'effetto di IL-15 sulla produzione di IFN-g, di MIP-1 alfa e RANTES e sull'attività citotossica di cellule NK HIV+. Abbiamo studiato: a) 12 pazienti con malattia da HIV avanzata naive per farmaci antiretrovirali (media VL=4.7 log; media CD4 =174); b) 21 soggetti con soppressione virologica dopo 12-36 mesi di HAART (CD4=673.2). Le cellule NK sono state isolate con metodica immunomagnetica utilizzando NK Cell Negative Isolation Kit (Dynal, Biotech, Oslo, Norway). Le cellule NK isolate sono state pre-trattate con IL-15 (100 ng/ml). I sovranatanti sono stati analizzati per le concentrazioni (pg/ml) di IFN-gamma, di MIP-1 alfa e RANTES mediante ELISA. Le cellule NK isolate sono state analizzate per valutare l'attività citotossica nei confronti di cellule bersaglio K562.

Risultati: La produzione di IFN-g, MIP-1 alfa e RANTES (media) da parte delle NK di pazienti AIDS naive (57.8, 307.5, 638, rispettivamente) era significativamente ridotta rispetto ai livelli trovati nei pazienti con soppressione virologica post-HAART (166.1, 706.2, 836.5, rispettivamente) ($p<0.05$). In un altro set di esperimenti abbiamo osservato un incremento della produzione di citochine e chemochine dopo stimolazione *in vitro* delle NK con IL-15. Nei pazienti AIDS naive, la stimolazione con IL-15 ha indotto un incremento nella produzione di IFN-g, MIP-1 alfa e RANTES (355.9, 928.4, 1064, rispettivamente) ($p<0.05$). Inoltre, IL-15 determinava un incremento significativo di MIP-1 alfa(1183) nei pazienti HAART-responder ($p<0.005$). In un'altra serie di esperimenti, IL-15 induceva un incremento dell'attività citotossica delle NK. L'unità litica (LU) per il medium da solo (160/107 cellule effettrici) era 215% più bassa rispetto alla LU dopo stimolazione con IL-15 (505/107 cellule effettrici).

Conclusioni: Le cellule NK rappresentano una componente fondamentale nella risposta immune innata in corso di infezione da HIV. Recenti studi indicano come le cellule NK siano in grado di controllare la replicazione di HIV allo stesso modo delle cellule CD8+. Pertanto tali cellule possono essere un importante target per le strategie immunoterapeutiche dell'infezione da HIV. In nostri dati indicano come IL-15 sia in grado di recuperare la deficiente produzione di citochine e chemochine da parte della cellule NK nei pazienti con AIDS, contribuendo inoltre all'incremento della loro attività citotossica.

Contributo: 30F.33

STUDIO INTEGRATO GENOTIPICO E FENOTIPICO SULLA CAPACITÀ REPLICATIVA DI VARIANTI DI HIV-1 RESISTENTI A FARMACI ANTIRETROVIRALI

Stefano Menzo* (*Polo Universitario Ospedaliero, Ospedali Riuniti "Umberto I"- G. M. Lancisi, G. Salesi*); Daniela Frugis (*); Manuela Vecchi (*); Massimo Clementi** (*IRCCS San Raffaele, Milano*); Antonella Castagna (**); Patrizia Bagnarelli (*)

Background: Sono sempre più diffusi i ceppi di HIV-1 resistenti ai farmaci antiretrovirali. Nell'ambito di una rincorsa tra l'impiego di nuovi farmaci e lo sviluppo di nuove resistenze è cruciale razionalizzare l'uso di nuovi e vecchi composti per tenere sotto controllo più a lungo possibile la viremia. Per quanto riguarda i farmaci già disponibili, la sperimentazione è ancora necessaria per comprendere la riduzione della capacità replicativa nei mutanti resistenti ad alcuni composti. Studi specifici potranno chiarire se sarà possibile integrare al meglio nella terapia in soggetti con ridotte opzioni terapeutiche tenendo puntando sul mantenimento di una bassa capacità replicativa. Per quanto riguarda i nuovi composti, prima della loro diffusa applicazione, è necessario studiare a fondo i meccanismi che portano a resistenza, la barriera genetica per questa resistenza e le interazioni con altri trattamenti.

Metodi: Sequenziamento nucleotidico delle sequenze virali amplificate da plasma. Costruzione di cloni molecolari ricombinanti di HIV-1 (basati sulla sequenza di NL4/3) che incorporano, nelle regioni pol ed env, sequenze amplificate dai campioni clinici di soggetti trattati. Studio fenotipico dei cloni ricombinanti su cellule U87 (transgeniche per CXCR4), in presenza ed in assenza di farmaci per valutarne resistenza e capacità replicativa.

Risultati: Sono stati studiati 2 gruppi di soggetti sieropositivi in fallimento terapeutico, in collaborazione con la Clinica di Malattie Infettive dell'Ospedale San Raffaele di Milano: i soggetti dei due gruppi hanno ricevuto un trattamento diverso per un follow-up di 48 settimane: a) interruzione totale b) monoterapia con lamivudina. Lo studio genotipico e fenotipico ha permesso di stabilire che la monoterapia con lamivudina ha impedito la ricomparsa del virus selvaggio con elevata capacità replicativa (che invece avveniva puntualmente nei soggetti in interruzione completa), e manteneva il virus multiresistente e a bassa capacità replicativa selezionato dal trattamento precedente. Solo alcuni dei ceppi resistenti sono risultati parzialmente sensibili all'azione della lamivudina, valutata a concentrazioni fisiologiche. I pazienti trattati con lamivudina hanno tratto un sensibile vantaggio clinico rispetto a quelli in interruzione. Sono in progetto ulteriori studi per verificare l'impatto della mutazione 184V sull'evoluzione di altre regioni del genoma di HIV.

Conclusioni: Questo studio pilota di fenotipo ricombinante ha permesso di analizzare per la prima volta il rapporto tra capacità replicativa di varianti multiresistenti *in vitro* e i parametri clinici *in vivo*. Molti studi saranno ancora necessari in questa direzione, con l'obiettivo di raggiungere una visione globale del problema resistenze: è sempre più urgente elaborare strategie terapeutiche razionali per i soggetti in fallimento.

Contributo: 30F.34

VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ MITOCONDRIALE IN PAZIENTI CON INFEZIONE DA HIV-1 IN TERAPIA ANTIRETROVIRALE E STUDIO DI EFFICACIA DI UNA SUPPLEMENTAZIONE CON ANTIOSSIDANTI SUL RIPRISTINO DELLA FUNZIONE MITOCONDRIALE

Laura Milazzo* (*Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi di Milano*); Agostino Riva (*);
Benedetta Massetto (*)

Background: Gli inibitori nucleosidici della retrotrascrittasi (NRTI) possono provocare un danno mitocondriale mediante l'inibizione della DNA polimerasi γ umana con deplezione del DNA mitocondriale, danno alla catena respiratoria e conseguente comparsa di acidosi lattica, alterazioni del metabolismo dei glucidi e dei lipidi. Recentemente è stato utilizzato nella diagnostica delle patologie mitocondriali da terapia antiretrovirale un breath test che utilizza ^{13}C -metionina. Tale metodica, non invasiva, né radioattiva, si è dimostrata utile nella diagnosi precoce di alterazioni della catena respiratoria mitocondriale epatica in pazienti in ART, asintomatici o affetti da iperlattacidemia. Molecole ad azione antiossidante quali vitamina E, vitamina C, beta-carotene, acetilcarnitina hanno dimostrato efficacia nel ridurre i danni epatici in corso di steatoepatite. Scopo dello studio è quello di valutare in pazienti HIV positivi in terapia antiretrovirale e che mostrino un rialzo cronico delle transaminasi ovvero quadri di lipoatrofia, in assenza di virus epatitici: 1) la presenza di steatoepatite non alcolica (NASH) mediante ecografia e biopsia epatica; 2) la presenza di alterazione del metabolismo dei lipidi e glucidi; 3) l'alterazione dell'assetto citochinico e la presenza di segni di tossicità mitocondriale; 4) inoltre intendiamo valutare l'efficacia di una supplementazione con antiossidanti nel ridurre gli effetti tossici della ART sulla funzione mitocondriale.

Metodi: Verranno arruolati consecutivamente 60 pazienti con infezione da HIV in terapia antiretrovirale da almeno 1 anno, con ipertransaminasemia da almeno 6 mesi; i pazienti verranno randomizzati a continuare il regime di ART in corso senza alcuna supplementazione ovvero a ricevere una terapia antiossidante con vitamina E (800 mg/die), n-acetilcisteina (600 mg x 2/die) e acetilcarnitina (2 g/die) per 12 mesi. Verrà eseguita all'arruolamento biopsia epatica per lo studio istologico, ultrastrutturale e per il dosaggio del DNA mitocondriale epatico. Si procederà a monitoraggio dei seguenti parametri: ecografia addome superiore, metabolismo dei grassi e dei glucidi, breath-test con ^{13}C -metionina, dosaggio di IL-6 e TNF- α , dosaggio del DNA mitocondriale sui PBMC a 0-6-12 mesi dall'arruolamento.

Risultati: Sono stati fino ad ora arruolati nello studio 4 pazienti con ipertransaminasemia, di cui 3 maschi e 1 femmina. Sono stati sottoposti ad ecografia addome superiore e biopsia epatica con suddivisione del frustolo in 3 porzioni, di cui una per l'indagine istologica, una per l'analisi ultrastrutturale dei mitocondri e una per la quantificazione del DNA mitocondriale. I pazienti sono stati sottoposti a breath-test con ^{13}C -metionina. Sono stati infine congelati campioni di plasma, di siero e congelati in FCS e DMSO di PBMC per i futuri dosaggi di IL-6, TNF- α e per la quantificazione del DNA mitocondriale nei PBMC. Tutti e 4 i pazienti arruolati mostravano un quadro ecografico di steatosi in assenza di coinfezione con virus epatitici. L'esame istologico ha mostrato un quadro di steatosi micro-macrovacuolare in 2 pazienti e minimi segni di steatosi in 2 soggetti.

Conclusioni: Attualmente 2 pazienti sono stati randomizzati e hanno iniziato a ricevere la supplementazione con gli antiossidanti e 2 pazienti a proseguire la terapia in corso senza supplementazione.

Contributo: 30F.35

CIRCOLAZIONE DI CEPPI NON B DI HIV-1 IN ITALIA E PATTERNS DI RICOMBINAZIONE DELLA CRF02_AG NEL GENE POL

Gaetano Brindicci* (*Università degli Studi di Bari*); Grazia Punzi (*) (*Università degli Studi di Foggia*); Annalisa Saracino (*Università degli Studi di Foggia*); Maria Sodano (*) (*Università degli Studi di Foggia*); Antonella Lagioia (*) (*Università degli Studi di Foggia*); Laura Monno (*) (*Università degli Studi di Foggia*)

Background: Sebbene il ceppo B di HIV-1 sia tuttora predominante nei paesi occidentali, a livello globale la pandemia da HIV è prevalentemente sostenuta da sottotipi non-B. Specialmente a causa di fenomeni di immigrazione, le varianti non-B di HIV-1 sono attualmente largamente diffuse anche nei paesi occidentali con implicazioni su patogenesi, evoluzione di malattia, rischio di trasmissione, risposta al trattamento e caratteristiche di farmacoresistenza non ancora studiate sistematicamente. La diffusione riguarda non soltanto i ceppi non-B puri ma anche le forme ricombinanti (CRF). Attualmente si ritiene che le forme A, CRF01_AE e CRF02_AG siano responsabili di circa il 30% delle nuove infezioni. Le condizioni responsabili del processo di ricombinazione in specifici punti della sequenza e, soprattutto, le eventuali conseguenze cliniche e terapeutiche, sono ancora non spiegate. Il presente lavoro ha: 1) Valutato la prevalenza di sottotipi non-B nella pratica clinica; 2) Verificato la prevalenza delle CRFs; 3) Valutato i patterns di ricombinazione nell'ambito della forma ricombinante più frequente nella nostra casistica.

Metodi: Analisi retrospettiva di 609 sequenze del gene pol richieste per la valutazione della farmacosuscettibilità nel periodo 2000-2004. Normalizzazione delle sequenze nucleotidiche con sequenze di riferimento (Los Alamos) mediante il software Bioedit. Analisi filogenetica mediante il software di inferenza (Phylip). Correlazione con i dati demografici ed epidemiologici. Analisi dei patterns di ricombinazione genetica della CRF02_AG mediante la funzione di Bootscan (Simplot) e confronto con 122 sequenze del gene pol (Los Alamos) sottotipizzate come CRF02_AG.

Risultati: L'analisi filogenetica ha dimostrato la presenza nell'ambito della popolazione studiata di 83 (13.6%) sequenze non-B, il 50.6% delle quali ricombinanti (CRF01_AE = 9; CRF02_AG = 27; BF = 2; CRF06_cpx = 1; CRF14_BG = 1; AGK = 1; URF = 1) ed il 49.4% sottotipi non-B puri (A = 4; C = 15; D = 1; F = 12; G = 8; J = 1). Il 77% dei sottotipi non-B era ottenuto da pazienti di nazionalità non-italiana, l'85% dei quali provenienti da zone ad elevata endemia. L'analisi epidemiologica individuava 6 nuclei familiari, pertanto la prevalenza complessiva di ceppi non-B risultava = 12.3%, con una prevalenza assoluta della forma ricombinante CRF02_AG (4.1%) seguita dai sottotipi C (2.1%) ed F (1.8%). L'analisi dei patterns di ricombinazione delle sequenze CRF02_AG dimostrava una non-omogenea distribuzione dei breakpoints nell'ambito della proteasi (HXB2, nt 2253-2549). La proteasi coincideva interamente con i sottotipi G ed A nel 25% e 8% dei nostri casi; nel rimanente 67% i breakpoints erano nelle posizioni 2393 (54.2%) e 2413 (12.5%) corrispondenti alle posizioni amminoacidiche 43-50 o 50-57 della proteasi. Un unico breakpoint A/G era presente nelle posizioni 2730 e 2710 (trascrittasi inversa) rispettivamente nel 67% e 33% dei nostri pazienti.

Conclusioni: In Italia risulta non infrequente l'isolamento di ceppi di HIV non-B e tali ceppi sono presenti non esclusivamente in immigrati, ma anche in persone di nazionalità italiana. Accanto a ceppi non-B puri, coesistono ceppi variamente ricombinanti. Lo studio dei siti di ricombinazione nei ceppi AG, i più frequenti nella nostra casistica, ha dimostrato una ancora più estesa variabilità genetica anche nell'ambito dello stesso ceppo ricombinante, più evidente nella regione della proteasi. Le conseguenze di tale osservazione in termini di risposta alla terapia non sono attualmente valutabili e meritano ulteriori e mirati studi.

Contributo: 30F.36

HIGH CONSERVATION OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE UNDER DRUG PRESSURE DESPITE A CONTINUOUS APPEARANCE OF MUTATIONS

Francesca Ceccherini Silberstein* (*Dip. di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Federico Gago (*Dept. of Pharmacology, University of Alcalá, Spain*); Maria Santoro (*) ; Caterina Gori** (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Valentina Svicher (*) ; Roberta D'Arrigo (**); Massimo Ciccozzi (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Ada Bertoli (*) ; Jan Balzarini (*Rega Institute for Medical Research, K. U. Leuven, Belgium*); Claudia Balotta (*Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi di Milano*); Mauro Moroni (***) ; Andrea Antinori (**); Antonella D'Arminio Monforte (***) ; Carlo Federico Perno (*)

Background: The identification of conserved regions within the HIV-1 genome allows a better characterization of essential regions in the viral proteins, and can help in the design of new therapeutic strategies aimed to drive the virus to mutate at key amino acids that are crucial for the maintenance of sufficient viral fitness.

Methods: To define the extent of sequence conservation in HIV-1 reverse transcriptase (RT) *in vivo*, the first 320 amino acids of RT obtained from 2236 plasma-derived samples from a well-defined cohort of 1704 HIV-1 infected individuals (457 drug-naïve and 1247 drug-treated) were analyzed and examined in structural terms.

Results: In naïve patients, 233 out of these 320 residues (73%) were conserved (<1% variability). The majority of invariant amino acids clustered into defined regions comprising between 5 and 29 consecutive residues. Of the nine longest invariant regions identified, some contained residues and domains critical for enzyme stability and function. In patients treated with RT inhibitors, despite profound drug pressure and the appearance of mutations primarily associated with resistance, 202 amino acids (63%) remained highly conserved, and appeared mostly distributed in regions of variable length. This finding suggests that participation of consecutive residues in structural domains is strictly required for cooperative functions and sustainability of HIV-1 RT activity.

Conclusions: Besides confirming the conservation of amino acids that are already known to be important for catalytic activity, stability of the heterodimer interface, and/or primer/template binding, other 62 new invariable residues are now identified and mapped onto the three-dimensional structure of the enzyme. This new knowledge could be of help in the structure-based design of novel resistance-evading drugs.

Grant: 30F.37

EFFETTO DELLE SOSPENSIONI DI TERAPIA ANTIRETROVIRALE CD4-GUIDATE SUL CONTENUTO DI DNA MITOCONDRIALE NEI LINFOCITI T PERIFERICI

Cristina Mussini* (*Clinica di Malattie Infettive, Modena*); Marcello Pinti** (*Dip. di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Modena*); Roberto Bugarini (**); Vanni Borghi (*); Milena Nasi (**); Elisa Nemes (**); Leonarda Troiano (**); Giovanni Guaraldi (*); Andrea Bedini (*); Roberto Esposito (*)

Background: L'infezione da HIV di per se e la terapia antiretrovirale altamente efficace (HAART) possono alterare la funzionalità mitocondriale, determinando un decremento del contenuto di DNA mitocondriale (mtDNA). Scopo del nostro studio è stato di valutare se le interruzioni CD4-guidate siano in grado di restaurare il contenuto di mtDNA nei linfociti.

Metodi: È stato condotto uno studio prospettico nel quale sono stati arruolati pazienti HIV positivi in terapia HAART con una conta di linfociti CD4+>500 cellule/μL che hanno interrotto la HAART per diversi periodi di tempo. I campioni biologici sono stati raccolti al baseline e ogni due mesi durante il periodo di interruzione terapeutica, mentre dopo la reintroduzione della HAART sono stati effettuati dopo 2 mesi e ogni 4 mesi. Il contenuto di mtDNA per cellula nei linfociti T CD4+ e CD8+ è stato quantificato utilizzando un metodo originale di real time PCR. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando i modelli misti e la struttura autoregressiva della varianza-covarianza per ogni paziente.

Risultati: 30 pazienti sono stati trattati per una media di 107 mesi (range: 27-197). La conta mediana dei CD4+ all'interruzione era di 702 cellule/μL (range 547-798). Il tempo mediano di osservazione dall'interruzione era di 11.3 mesi (range 4-26). L'analisi del contenuto di mtDNA ha mostrato che l'interruzione di terapia determinava un aumento significativo dello stesso nei linfociti T CD8+ T, che iniziava però soltanto 6 mesi dopo l'interruzione (+5.12 copie per mese da 0 a 6 mesi, p=0.37 e +26.96 copie per mese da 6 a 12 mesi, p<0.0001).

Conclusioni: Questo è il primo studio che dimostra come il contenuto di mtDNA possa aumentare nei linfociti di sangue periferico, ma soltanto dopo almeno 6 mesi di interruzione di terapia. La naturale conseguenza è che interruzioni più brevi, dovute a decisioni sia dei pazienti sia dei curanti, sono difficilmente in grado di ripristinare il contenuto di mtDNA e quindi di diminuire la tossicità correlate alla HAART.

Contributo: 30F.38

STUDIO ISS PART ANALISI PRELIMINARE

Lucia Palmisano* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Raffaella Bucciardini (*); Roberta Amici (*); Mauro Andreotti (*); Romano Arcieri (*); Vincenzo Fragola (*); Clementina Maria Galluzzo (*); Elena A. P. Germinario (*); Maria Grazia Mancini (*); Maria Franca Pirillo (*); Liliana Weimer (*); Marina Giuliano (*); Stefano Vella (*)

Background: La terapia HAART, nonostante la sua efficacia, si associa tuttavia a pesanti effetti collaterali a lungo termine, che possono compromettere la *compliance* dei pazienti e incidere negativamente sulla loro qualità di vita. Per questo motivo, intorno al 2000 sono iniziati numerosi studi per verificare se, in pazienti con infezione da HIV cronica e replicazione virale stabilmente soppressa, fosse possibile interrompere in maniera “programmata” il trattamento. L’ISS-PART, iniziato nel 2002, a tutt’oggi resta uno dei pochi trial multicentrici, randomizzati e controllati sulle STI nell’infezione cronica da HIV.

Metodi: 273 pazienti con CD4>350/mmc, HIV RNA>400 copie/ml da almeno 6 mesi e nadir dei CD4>100/mmc, sono stati arruolati in 71 centri italiani e randomizzati a uno dei seguenti bracci: terapia continua (A) o terapia intermittente (B): 5 interruzioni di durata 1, 1, 2, 2 e 3 mesi, rispettivamente, ciascuna separata da 3 mesi di terapia. Durante il periodo di sospensione, era prevista la ripresa terapeutica se l’HIV RNA superava le 50.000 copie/ml o i CD4 presentavano una diminuzione >25% rispetto al valore alla randomizzazione. La durata complessiva dello studio è stata di 24 mesi/paziente. Tutti i pazienti sono stati monitorizzati per HIV RNA, CD4 e comparsa nel plasma di mutazioni genotipiche associate a resistenza (B). In un sottogruppo di pazienti sono stati prelevati campioni aggiuntivi di plasma e cellule per ulteriori esami immuno-virologici (HIV DNA, TREC, numero di cellule infette, marker di attivazione, espressione di citochine, studio della variabilità dell’env).

Risultati: Alla randomizzazione, il 70% della popolazione era di sesso maschile, l’età media era 40 anni e la via di trasmissione contagio sessuale nell’85% dei casi. Il valore medio dei CD4 era 757/mmc, i CD4 pre-HAART 419 e la durata media della terapia 27 mesi. Il 33,5% dei soggetti aveva effettuato un cambio di terapia per scarsa tollerabilità o difficoltà di aderenza (non per fallimento virologico). La terapia attuale consisteva in una HAART contenente PI nel 25% dei soggetti, NNRTI nel 67% e basata su 3 NRTI nel 20%. I due bracci di trattamento erano omogenei per le principali caratteristiche demografiche e cliniche. Lo studio è terminato nel giugno 2004. Un totale di 80 pazienti (29%) sono usciti dal protocollo, 25 (18%) del braccio A e 55 (40%) del braccio B. Al termine del follow-up la percentuale di soggetti con CD4>500/mmc era superiore nel braccio A, mentre non c’erano differenze tra i gruppi per la percentuale di soggetti con CD4>350 e con HIV RNA<400 copie. Il numero di eventi avversi gravi e di eventi HIV-correlati è stato sovrapponibile, mentre la tossicità di laboratorio è stata minore nel braccio B. La determinazione delle resistenze genotipiche ha mostrato la comparsa di mutazioni nel plasma, durante le STI, nel 29% dei soggetti del braccio B. Sono in corso le analisi sui fattori predittivi della comparsa di resistenze e sull’impatto di queste ultime sulla risposta virologica.

Conclusioni: I dati preliminari dello studio ISS PART hanno evidenziato una ragionevole “safety” della terapia intermittente per quanto riguarda numero dei CD4 e risposta virologica al termine del follow-up. Restano tuttavia da approfondire i fattori predittivi dell’elevato numero di uscite dal protocollo e della comparsa di resistenze nel braccio B e il potenziale impatto che le resistenze possono avere sulla risposta virologica a lungo termine.

Contributo: 30F/L

RECETTORI T CHIMERICI PER IMMUNOTERAPIA ADOTTIVA IN AIDS

Sara Masiero* (*Università degli Studi di Padova*); Claudia Del Vecchio (*); Paola Sette (*); Arianna Calistri (*); Antonella Caputo (*); Giorgio Palù (*); Cristina Parolin (*)

Background: Nel corso dell'infezione da HIV-1, nonostante l'impiego dell'HAART sia in grado di determinare una riduzione della carica virale ed un significativo recupero delle cellule T CD4+, non si osserva una ricostituzione completa del repertorio immunologico. In tale contesto, la nostra ricerca si è focalizzata sull'impiego della immunoterapia adottiva con linfociti T ingegnerizzati ad esprimere TCR chimerici (TCRc) in grado di riconoscere specifici antigeni di HIV-1 con modalità MHC-indipendente.

Metodi: Sono state utilizzate i) tecniche di biologia molecolare per lo sviluppo di vettori retrovirali esprimenti TCRc e di plasmidi esprimenti Ig chimeriche e ii) tecniche di biologia cellulare per valutare la funzionalità dei costrutti.

Risultati: Abbiamo sviluppato un TCRc (TCR/105) costituito da una porzione extracellulare derivata da un scFv, in grado di riconoscere la gp120 di HIV-1, legata a porzioni transmembrana ed intracellulare per la trasduzione del segnale di attivazione nei linfociti T derivate dalla catena zeta del CD3. Il scFv utilizzato deriva dall'anticorpo monoclonale F105, che riconosce la gp120 di diversi isolati virali, in prossimità del sito di legame al CD4. Abbiamo dimostrato che il TCR/105 è in grado di indurre secrezione di IL-2 in seguito al riconoscimento di gp120 e di attivare il pattern di trasduzione del segnale. La valutazione delle funzioni effettrici del recettore chimerico nei confronti dell'antigene specifico è stata realizzata impiegando cellule primarie CD8+ trasdotte con vettori oncovirali e lentivirali e, come bersaglio, cellule linfoblastoidi esprimenti la gp120 in seguito a trasfezione o ad infezione ed è stata saggiata la citotossicità utilizzando un saggio classico di rilascio di cromo. I risultati hanno indicato una efficienza di lisi del 30-35% e specifica in quanto inibita dalla presenza di anticorpi anti-gp120 e anti-MHC. (Masiero *et al.*, 2005). Allo scopo di migliorare la risposta cellulare, la fase successiva della ricerca si è concentrata sullo sviluppo di un TCRc contenente, in aggiunta allo stimolo di attivazione indotto dalla catena zeta del CD3, la molecola segnale di co-stimolazione CD28. Inoltre, sono in corso esperimenti per selezionare, mediante una libreria fagica ad elevata rappresentatività, scFv specifici per la glicoproteina gp120 di HIV-1 di isolati dual-tropici. Un altro approccio di immunocostituzione è rappresentato dalla cosiddetta "somatic transgene immunization". Abbiamo sviluppato un vettore plasmidico in grado di esprimere, sotto il controllo di elementi B-specifici, una catena pesante chimerica di una Ig contenente nel dominio CDR2 della regione variabile un epitopo immunodominante universale derivato dall'antigene di superficie del parassita della malaria, in grado di indurre una efficiente risposta immunitaria di tipo T helper e, a livello della CDR3, epitopi immunodominanti delle proteine virali Tat o Gag. I risultati ottenuti in seguito a trasfezione delle cellule linfocitarie B con i vettori plasmidici sviluppati indicano che tali immunoglobuline chimeriche vengono espresse e secrete. Attualmente sono in corso esperimenti nel modello animale murino, allo scopo di valutare se gli epitopi virali selezionati sono in grado di sviluppare una risposta immunitaria.

Conclusioni: I risultati di questi studi contribuiranno a chiarire l'efficacia dell'immunoterapia nel trattamento dell'infezione da HIV-1 e nelle patologie correlate.

Contributo: 30F.39

CORRELATI D'IMMUNOTERAPIA INTERMITTENTE CON IL-2: ANALISI DELLE POPOLAZIONI T CD4+ E DELL'USO CORECETTORIALE CHEMOCHINICO DEGLI ISOLATI VIRALI

Silvia Grezzi* (*IRCCS S. Raffaele, Milano*); Claudio Fortis (*) ; Francesca Neri (*Ospedale Bambin Gesù, Roma*); Elisa Vicenzi (*) ; Laura Soldini (*Laboraf SpA*); Fabrizio Veglia (*ISI, Torino*); Silvia Nozza (*) ; Giuseppe Tambussi (*) ; Adriano Lazzarin (*) ; Guido Poli (*)

Background: L'immunoterapia basata sulla somministrazione intermittente di IL-2 è attualmente in valutazione per la sua efficacia clinica in studi di fase III (ESPRIT, SILCAAT) dopo la dimostrazione della sua capacità d'indurre significativi e duraturi aumenti del numero di linfociti T CD4+ circolanti. Abbiamo studiato quindi l'impatto di questa forma d'immunoterapia, in associazione a classica terapia antiretrovirale (ART), sulle popolazioni T linfocitarie e sulla natura del virus infettante a livello d'isolati di HIV e delle loro specificità di uso corecettoriale.

Metodi: Lo studio è stato eseguito su una coorte d'individui HIV+ che hanno ricevuto o meno IL-2 intermittente in associazione ad ART come precedentemente descritto (G. Tambussi *et al.*, *J. Inf. Dis.*, 183:1476-1484, 2001). L'analisi del fenotipo e dell'attivazione delle popolazioni di linfociti T di sangue periferico è stata effettuata mediante FACS, mentre la determinazione dei livelli di sjTREC è stata valutata con metodica TaqMan di PCR quantitativa. L'isolamento virale è stato eseguito sia da plasma che da PBMC all'inizio dello studio (t0) e dopo 12 mesi (t12). Il fenotipo degli isolati virali è stato definito inizialmente su cellule MT-2 (SI/NSI) e successivamente per uso corecettoriale mediante un pannello di cellule U87 permanentemente trasfettate con CD4 e diversi recettori chemochinici.

Risultati: A livello fenotipico, la somministrazione di IL-2 induceva un'espansione di linfociti T CD4+ coesprimenti CD25 in assenza di CD69, popolazione che potrebbe quindi comprendere cellule T regolatorie (Treg) implicate nei meccanismi di tolleranza immunologica periferica. Per contro, le cellule CD8+ esprimevano preferenzialmente HLA-DR. La perdita di sj TREC al t12 in coloro che hanno ricevuto IL-2 era comparabile a quella di pazienti che hanno ricevuto solo ART, nonostante l'espansione di linfociti T CD4+ sia significativamente superiore. La terapia con IL-2 non influenzava la frequenza d'isolamento virale, la quale è risultata fortemente correlata ai livelli di viremia anche dopo 12 mesi di IL-2. Gli individui negativi per isolamento virale (ISO-) risultavano inoltre avere una maggiore espansione di cellule CD4+ al t12 rispetto agli ISO+. Gli individui ISO+ caratterizzati dall'isolamento di un virus NSI/R5 al t0 e trattati con ART+IL-2 avevano una significativamente minore probabilità di sviluppare un virus SI/X4 che individui trattati con sola ART.

Conclusioni: L'espansione di linfociti T CD4+CD25+CD69- in seguito a somministrazione di IL-2 suggerisce un potenziale ruolo di cellule Treg negli effetti immuno-ricostruttivi e di controllo dell'infezione di HIV da parte di questa forma d'immunoterapia. La comparabile diminuzione del n. di TREC in individui riceventi solo ART o ART+IL-2, quest'ultimi caratterizzati da una superiore espansione di linfociti T CD4+, suggerisce un'importante contributo di cellule vergini timiche all'espansione linfocitaria CD4+ indotta dalla citochina. Il mantenimento del fenotipo virale NSI/R5 in individui trattati con ART+IL-2 potrebbe riflettere gli aumentati livelli di espressione di CCR5 indotti dalla citochina o essere un correlato di ricostituzione immunologica, in quanto i ceppi virali SI/X4 emergono tipicamente prima dell'AIDS conclamato.

Contributo: 30F.40

“DELIVERY” VAGINALE DI MICROBICIDI PER MEZZO DI BATTERI COMMENSALI RICOMBINANTI

Gianni Pozzi* (*Università degli Studi di Siena*); Emmanuelle Palumbo (*)

Background: Cyanovirin-N (CV-N) is a 101-amino-acid protein isolated from the cyanobacterium *Nostoc ellipsosporum* which exerts virucidal activity at low nanomolar concentrations, against both primary isolates and laboratory-adapted strains of HIV-1, HIV-2, simian immunodeficiency virus, and feline immunodeficiency virus. It has a number of properties that are highly desirable for a microbicide. *Lactobacillus* strains are part of the normal vaginal flora and may be the most appropriate commensal to be used for delivery of microbicides to human vaginal mucosa. *Lactobacilli* producing CV-N may therefore have considerable potential as effective microbicidal agent. Moreover, this work will also provide valuable insight into the requirements for expression of microbicides. To determine the feasibility of this approach, we were firstly implementing an expression system of cyanovirin in the model and commensal NCIMB8826 strain of *Lactobacillus plantarum* as its genome was available. Then we will transfer it in *Lactobacillus* strains from the human vagina.

Methods: We were implementing protein secretion and surface display expression systems based on a native cell surface protein of *L. plantarum*. As *L. plantarum* does not possess the S-layer protein, we selected the alternative translational fusion partner encoded by the lp_2578 gene and containing features very typical of cell wall covalently anchored surface proteins, including amino acid repeat regions, anchoring signals, and a secretion signal. Its secretion and cell wall sorting signals were used in combination with the cyanovirin to secrete or covalently anchor the lp_2578-CV fusion protein to the cell wall. The fusions to generate had to be placed downstream of the strong promoter (Pldh) and the ribosome binding site (RBSldh) of the lactate dehydrogenase of NCIMB8826.

Results: All the PCR amplified DNA fragments needed to construct the secretion/anchoring cassettes were subcloned in pGEMTeasy vector. The fusion partners were firstly assembled in the pGEMTeasy vector by directional cloning and the fusions achieved were then transferred into pGIZ906 vector downstream of the Pldh and RBSldh. Both secretion cassettes generated by fusing the cyanovirin with a short (33 aa) or a longer (136 aa) N-terminal fragment containing the lp_2578 putative secretion signal were cloned into pGIZ906. These expression vectors were successfully introduced in *Lb. plantarum* as confirmed by PCR. The efficient secretion of cyanovirin in the external medium was demonstrated by a western blot analysis of the supernatant using anti-CV serum. Two surface display constructs have already been generated consisting of the cyanovirin gene fused to a 226aa-C-terminal fragment of Lp_2578 preceded by the short or the longer N-terminal fragment. These expression vectors were successfully introduced in *Lb. plantarum* as confirmed by PCR. Promising results were obtained for several clones by colony blot experiments using the anti-CV serum. This will be confirmed by FACS analysis of the bacteria and western blot analysis of fusion proteins in different cell fractions.

Conclusions: We were able to develop a new system of secretion of a cyanovirin in *Lactobacillus plantarum* using homologous transcription, translation signals and signal peptide. On the other hand, our preliminary results about cyanovirin surface display strongly suggest the presence of cyanovirin fixed to our recombinant *Lactobacillus* cells and the demonstration of this presence is under progress. In order to obtain stable recombinant strains, the next step will be to integrate the expression cassettes in the chromosome of the *Lactobacillus* strains.

Grant: 30F.41

PROGETTO SCOLTA: INCIDENZA DELLE REAZIONI AVVERSE GRAVI IN UNA COORTE DI PAZIENTI TRATTATI CON LOPINAVIR/R

Paolo Bonfanti* (*I Divisione Malattie Infettive, Ospedale L. Sacco, Milano*); Tiziana Quirino (*Divisione di Malattie Infettive, Ospedale di Busto Arsizio*); Elena Ricci (*); Gian Marco Vigevani (*)

Background: I nuovi farmaci antiretrovirali introdotti in questi anni hanno modificato il decorso clinico dell'infezione da HIV, riducendone la mortalità e diminuendo l'incidenza delle infezioni opportunistiche ad essa correlate. Il secondo aspetto di mutazione rispetto al passato è stato l'emergere di un vasto numero di effetti collaterali alle terapie, prima sconosciuti. Benché gli studi clinici controllati abbiano affrontato tali problematiche, non hanno potuto dare risposte esaustive rispetto l'impatto della tossicità nella gestione clinica della terapia antiretrovirale. Date queste premesse risulta evidente la necessità di una sorveglianza attiva soprattutto focalizzata sui farmaci di recente registrazione, in quanto meno collaudati rispetto agli altri nella pratica clinica.

Metodi: Il Progetto SCOLTA (Surveillance Cohort Long-Term Toxicity Antiretrovirals) origina con l'intento di attuare un sistema di farmacovigilanza relativo ai farmaci antiretrovirali di nuova introduzione e come sistema di sentinella per le reazioni avverse inattese. È un sistema di rilevazione on-line delle reazioni avverse ideato dal gruppo CISAI (Coordinamento Italiano per lo Studio Allergia e Infezione da HIV) appositamente per i farmaci antiretrovirali; a tale scopo è stato creato il sito web www.cisai.info. Collaborano al progetto 25 centri di malattie infettive. Si tratta di uno studio prospettico multicentrico realizzato mediante la modalità degli studi di coorte; vengono infatti create coorti di pazienti che assumono i farmaci antiretrovirali di nuova introduzione nell'arena clinica, una coorte per ogni nuovo farmaco. Tali gruppi di pazienti vengono seguiti dalla data di assunzione del farmaco fino alla sospensione. Vengono segnalate le reazioni di III e IV grado della classificazione ACTG e tutti gli eventi inattesi e rari. Sinora sono state attivate le coorti di pazienti in trattamento con Lopinavir/r, Tenofovir, Atazanavir ed Enfutivide.

Risultati: Riferiamo i dati preliminari relativi alla coorte Lopinavir/r. Dal 1 ottobre 2002 al 30 novembre 2004 sono stati arruolati 756 pazienti, 552 maschi, età media 40.3 anni, media dei linfociti CD4 all'arruolamento 267. 151 pazienti erano naive per trattamento con antiretrovirali. Il tempo medio di follow-up è di 15.3 mesi. Dei 756 pazienti arruolati, 439 proseguono il trattamento, in 244 casi la terapia è stata sospesa e 73 pazienti sono persi al follow-up. La principale causa di sospensione è la comparsa di eventi avversi (32% dei casi), la seconda è la semplificazione terapeutica (25%). Sono stati segnalati 110 eventi di III e IV grado. Il tasso di incidenza di eventi avversi per 100 anni persona è 13.03 (CI 95% 12.78-13.27) se valutato per tutti i pazienti in trattamento, 9.18 (CI 95% 8.68-9.68) per i pazienti naive e 13.8 (CI 95% 13.53-14.07) per i pazienti experienced. L'incidenza degli eventi metabolici è stata di 6.04 (5.8-6.2) eventi per 100 anni persona, 2.4 (2.3-2.5) l'incidenza degli eventi gastrointestinali e 0.59 (0.54-0.64) l'incidenza della tossicità epatica.

Conclusioni: La comparsa di reazioni avverse è la principale causa di interruzione in questa coorte di pazienti trattati con Lopinavir/r. L'incidenza di eventi avversi è superiore nei soggetti experienced rispetto ai pazienti naive. Gli eventi metabolici, in particolare le dislipidemie, sono le reazioni gravi osservate con maggior frequenza; bassa l'incidenza di epatotossicità.

Contributo: 30F.43

COSTRUZIONE DI UN ALFAVIRUS CHIMERICO RICOMBINANTE ENV-SPECIFICO PER L'ELIMINAZIONE SELETTIVA DELLE CELLULE IN FETTATE IN MODO LATENTE DA HIV

Antonia Radaelli* (*Università degli Studi di Milano*); Carlo Zanotto (*); Valeria Basavecchia (*);
Manuela Paganini (*); Carlo De Giuli Morghen (*)

Background: Il progetto di ricerca riguarda la costruzione di un virus ad azione citocida caratterizzato dalla capacità di penetrare ed uccidere selettivamente cellule infettate latentemente dal virus HIV, la cui eliminazione può condurre alla guarigione del soggetto affetto da AIDS. Infatti, mentre si ritiene che l'applicazione della terapia HAART sia in grado di eliminare virtualmente tutto il virus circolante, per una completa e definitiva guarigione è invece necessario eliminare completamente il serbatoio naturale di nuovi virioni costituito dalle cellule nelle quali il genoma di HIV è integrato. A tale scopo il progetto prevede la modifica genetica del virus Sindbis in modo tale da alterarne il tropismo indirizzandolo selettivamente alle cellule esprimenti la molecola gp120 di HIV-1. La modifica consiste nella sostituzione della porzione N-terminale della glicoproteina di superficie E2, responsabile del legame virale alle cellule bersaglio, con il dominio D1 della glicoproteina CD4 umana, che contiene il sito di legame della gp120 di HIV-1. Sfruttando il suo effetto apoptotico, il nuovo virus chimera Sindbis/D1-CD4 dovrebbe infettare ed uccidere selettivamente tutte le cellule che esprimono la gp120 di HIV sulla loro superficie.

Metodi: Essendo il genoma del virus Sindbis costituito da RNA ad elica singola a polarità positiva, la sua ingegnerizzazione è avvenuta utilizzando un plasmide contenente il genoma completo del virus sotto forma di DNA a doppio filamento. Il dominio D1-CD4, responsabile del legame del virus HIV alle cellule CD4+, è stato amplificato mediante PCR usando come template un plasmide contenente la sequenza codificante completa del CD4 umano. Dopo amplificazione, tale sequenza è stata inserita all'estremità N-terminale del gene E2 di Sindbis che codifica per la glicoproteina contenente i domini responsabili del suo pantropismo. Partendo dal plasmide così modificato, il genoma è stato quindi trascritto *in vitro* in modo che i virioni ingegnerizzati venissero prodotti dopo lipofezione di cellule permissive BHK-21 di criceto e cellule VERO di scimmia.

Risultati: Le analisi molecolari effettuate mediante RT-PCR sull'RNA estratto dal virus Sindbis/D1-CD4 prodotto dopo lipofezione di cellule permissive hanno confermato la presenza del dominio D1 del CD4 nel genoma dei nuovi virioni. Per la rilevazione del segnale è stato tuttavia necessario utilizzare una reazione di RT-nested PCR. Analisi mediante ELISA volte a verificare la produzione di nuova progenie virale Sindbis/D1-CD4 non hanno invece rivelato un segnale positivo che è stato invece ottenuto con il virus Sindbis wt. Le analisi al microscopio elettronico per la conferma ultrastrutturale del rilascio di virus Sindbis/D1-CD4 sono ancora in corso.

Conclusioni: La caratterizzazione del mutante Sindbis/D1-CD4 ci fa ritenere che esso venga prodotto in quantità non sufficiente ad infettare le cellule bersaglio. Ciò può essere dovuto alla scelta del punto di inserimento del D1 che riduce o blocca l'assemblaggio della proteina D1-CD4. In particolare è possibile che il dominio D1 possa ostacolare la rimozione proteolitica della proteina E3 dal precursore pE3-E2. Per superare questo problema intendiamo riclonare la regione D1 aumentandone la distanza dal sito di taglio proteolitico, associandola o meno alla sua sequenza segnale ed al dominio D2. Questa strategia ci dovrebbe permettere di verificare il contributo di D1 al corretto folding ed inserimento nella membrana cellulare e, successivamente, nell'envelope virale.

Contributo: 30F.44

IMMUNORICOSTITUZIONE IN BAMBINI CON INFEZIONE VERTICALE DA HIV-1 TRATTATI CON UNA TERAPIA HAART SEMPLIFICATA

Caterina Cancrini* (*Cattedra di Clinica Pediatrica, Dip. di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Simone Pensieroso (*); M. Luisa Romiti (*); Paolo Palma** (*Cattedra di Clinica Pediatrica, Dip. di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" – Immunoinfeziologia, Ospedale Pediatrico Bambin Gesù*); Stefania Bernardi (**); Hippolite Tchidjou Kuekou (**); Francesca Romana Monzo (*); Silvia Di Cesare (*); Guido Castelli Gattinara (**); Paolo Rossi (**)

Background: I numerosi vantaggi di un' HAART precoce nei neonati, sia in termini di controllo virologico che di ricostituzione immunologica, sono stati ampiamente dimostrati. Una riduzione del carico terapeutico si è tuttavia resa necessaria al fine di prevenire la tossicità dovuta al lungo tempo di somministrazione di questi farmaci. Una coorte di bambini è stata inserita in un protocollo di semplificazione terapeutica, che prevedeva l'utilizzo di 3 analoghi dei nucleosidi (NRTI) e l'eliminazione dell'inibitore delle proteasi (IP). Al fine di verificare l'efficacia del trattamento di semplificazione sono stati studiati diversi parametri virologici e di immunoricostituzione.

Metodi: 19 pazienti precedentemente trattati con HAART sono stati inclusi in un protocollo terapeutico di semplificazione con 3 NRTI. I test di proliferazione linfocitaria a mitogeni, antigeni (PHA, PWM, OKT3, Candida, CMV) e ad antigeni HIV-specifici (p24, p17, gp41, gp120) sono stati eseguiti mediante incorporazione di Tim-H3. Spectratyping: PBMC derivati da sangue periferico dei pazienti sono stati separati mediante biglie magnetiche in CD4+ e CD8+. L'RNA estratto dalle cellule è stato retrotrascritto in cDNA e amplificato in PCR mediante l'uso di 24 primers per le famiglie Vbeta appaiati a un primer per il 3'Cbeta marcato per l'analisi al sequenziatore.

Risultati: I bambini seguiti durante il follow-up (48w) hanno mostrato una carica virale sotto il livello di misurabilità (RNA<50 copie/ml) e un numero di CD4 comparabile a quello di bambini sani di pari età. I test di proliferazione linfocitaria a mitogeni ed antigeni comuni sono risultati nella norma in tutti i pazienti. Nella maggior parte (79%) la risposta proliferativa ad almeno un antigene HIVspecifico è risultata presente. L'analisi del repertorio TCR ha mostrato un'ulteriore normalizzazione durante la terapia di semplificazione. Infatti in 6 dei 18 bambini si è evidenziata una normalizzazione del repertorio CD4+ e in 12 su 18 si sono mantenuti i profili già significativamente normalizzati durante la precedente HAART. Nella sottopopolazione CD8+, 8 dei 18 bambini hanno presentato una significativa normalizzazione del repertorio, mentre 5 su 18 una normalizzazione evidente sebbene di minore entità.

Conclusioni: La terapia di semplificazione è risultata efficace sia in termini di controllo virologico che di funzionalità immunologica. La generale tendenza alla normalizzazione della distribuzione delle famiglie del TCR in alcuni pazienti potrebbe, in parte, essere spiegata dall'eliminazione dell'inibitore delle proteasi nella precedente HAART. Gli inibitori delle proteasi sembrano infatti avere un ruolo immunosoppressivo non trascurabile.

Contributo: 30F.45

ATTIVITÀ *IN VITRO* DI NUOVI INIBITORI DELLA FUSIONE DIRETTI CONTRO UN CEPPI DI HIV-1 WILD-TYPE O RESISTENTI A T-20

Stefano Rusconi* (*Istituto di Malattie Infettive e Tropicali, Università degli Studi di Milano, Ospedale L. Sacco*); Elisabetta Bulgheroni (*); Ottavia Viganò (*); Andrea Scozzafava** (*Lab. di Chimica Bioinorganica, Università degli Studi di Firenze, Sesto Fiorentino (FI)*); Massimo Galli (*); Claudiu T. Supuran (**)

Background: Enormi progressi sono stati fatti nella comprensione del meccanismo di entrata di HIV-1 nella cellula ospite. L'identificazione dei corecettori virali e della struttura di una porzione della proteina dell'envlope virale che lega il recettore, hanno fatto luce su come Env sia in grado di mediare la fusione delle membrane cellulare e virale. Questa conoscenza è stata applicata con successo allo sviluppo di nuovi inibitori capaci di bloccare differenti passaggi del processo di entrata. Il nostro lavoro si è focalizzato sulla sintesi e sul saggio *in vitro* di nuovi inibitori dell'entrata.

Metodi: Usando AMD3100 come molecola base, abbiamo sintetizzato 4 poliamine macrocicliche per ottenere composti con bassa tossicità e aumentata attività sia contro isolati wild-type che contro virus resistenti a questa classe di farmaci. Le formule di questi 4 composti sono C₂₀H₂₆N₆*3HBr (composto A), C₁₈H₂₁N₅*3HBr (B), C₂₀H₂₈N₆*4HBr (C) e C₁₇H₂₃N₅*3HBr (D). Abbiamo esaminato l'attività *in vitro* del T-20 e di questi composti neo-sintetizzati su un isolato sensibile di HIV-1 in PBMC. Il controllo rappresentato da AMD-3100 (AnorMED, Langley, BC, Canada) è stato utilizzato a concentrazioni comprese tra 0,01 e 10 µM, T-20 (La Roche AG, Basel, Svizzera) tra 0,075 e 0,6 µg/ml e i 4 composti tra 0,01 e 10 µM.

Risultati: Risultati preliminari hanno mostrato che T-20 è in grado di inibire 14aPre a concentrazioni medie di IC₅₀ 0,213 µg/ml, ed è quindi paragonabile ad AMD-3100 (IC₅₀ = 0.829 µM). Le IC₅₀ ottenute per i 4 nuovi composti sono invece nel range micromolare; in particolare 3.511 µM per A, 2,595 µM per B, 3,084 µM per C and 2,436 per D. Ad alte concentrazioni dei farmaci, non è stato rilevato nessun effetto citotossico.

Conclusioni: Queste 4 poliamine macrocicliche rappresentano una nuova promettente classe di inibitori della fusione. Stiamo conducendo ulteriori esperimenti, sia su ceppi wild-type che resistenti al T-20 con molteplici mutazioni nella regione Env, combinando tra loro i farmaci, compresi i derivati di zinco delle stesse poliamine, per poter meglio caratterizzare questi presunti antagonisti del recettore CXCR4.

Contributo: 30F.46

TRE ANNI DI FOLLOW-UP IN PAZIENTI TRATTATI IN BASE A STI GUIDATE DAI CD4

Fredy Suter* (*Unità Operative Malattie Infettive, Ospedali Riuniti di Bergamo*); Franco Maggiolo (*U.S. Terapia Antivirale, Ospedali Riuniti di Bergamo*); Giampaolo Quinzan (*); Giampietro Gregis (*); Diego Ripamonti (*)

Background: Al fine di verificare la validità di una strategia basata su interruzioni strutturate di terapia guidate dai valori di CD4, pazienti che effettuavano una HAART efficace (HIV-RNA < 50 copie/ml) e con una risposta immunologica sostenuta (CD4 > 800 cellule/mcl) sono stati randomizzati 2:1 a interrompere o continuare la terapia HAART.

Metodi: Studio prospettico, controllato, randomizzato. Nel braccio in STI l'end-point primario era quello di mantenere i valori dei CD4 sopra le 400 cellule/mcl. Vengono riportati i risultati dei primi 3 anni di follow-up.

Risultati: Sono stati arruolati 111 pazienti (74 in STI e 37 di controllo). Alla randomizzazione i due gruppi sono risultati simili per età, sesso, fattori di rischio per l'infezione da HIV, precedente esposizione ai farmaci antiretrovirali, durata della terapia e periodo con viremia soppressa. La media dei CD4 è risultata di 1083 cellule nel gruppo di controllo e di 1063 nel gruppo STI. Nel periodo di follow-up nessun paziente ha presentato una progressione di malattia. L'unico fattore predittivo del calo dei linfociti CD4 durante la STI è risultato il valore di nadir degli stessi CD4 ($P < 0.0001$). I pazienti che avevano iniziato la HAART con valori di CD4 sempre superiori alle 500 cellule/mcl hanno interrotto, praticamente nella totalità, per tutto il periodo di follow-up la terapia antiretrovirale. Per contro i pazienti che in precedenza avevano presentato un nadir dei CD4 < 200 cellule/mcl hanno ripreso, invariabilmente, la terapia antiretrovirale entro i 18 mesi dalla sospensione. I pazienti con valori di CD4 al nadir compresi tra 200 e 350 cellule/mcl si comportavano in modo intermedio, ma più simile a quelli con nadir inferiore. I pazienti con valori di CD4 al nadir compresi tra 350 e 500 cellule/mcl, non differivano, invece, in modo significativo da quelli che avevano iniziato la terapia con più di 500 CD4/mcl. Tutti i pazienti in cui la terapia è stata ripresa hanno presentato un rapido incremento dei CD4 rispetto ai valori basali ed una riduzione dei livelli di HIV-RNA sotto le 50 copie/ml. Nei pazienti in cui è stata effettuata più di una STI il secondo periodo di interruzione è risultato significativamente più lungo del primo (media 11.9 mesi versus 6.5 mesi; $P = 0.045$).

Conclusioni: La HAART può essere interrotta per tempi prolungati e senza danni in pazienti che abbiano iniziato la terapia con nadir di CD4 superiori a 350 cellule/mcl. In questi pazienti, una volta ottenuta una immunoricostruzione stabile, è ragionevole proporre una terapia intermittente. I pazienti con valori di CD4 al nadir più bassi (< 350 cellule/mcl), malgrado un'ottima immunoricostruzione, presentano un rischio significativamente aumentato di calo repentino del numero di CD4. Questo tipo di osservazione ripropone una riflessione su quale sia il momento più opportuno per iniziare la HAART.

Contributo: 30F.47

IMPIEGO DI FARMACI IMMUNOMODULANTI IN PAZIENTI HIV+ TRATTATI CON HAART IN CORSO DI INFEZIONE ACUTA PRIMARIA DA HIV STUDIO PILOTA

Giuseppe Tambussi* (*IRCCS San Raffaele, Milano*); Chiara Tassan Din (*) ; Adriano Lazzarin (*Università Vita-Salute, Milano*)

Mycophenolate mofetil (MMF) reduces the pool of dividing and activated CD4+ T cells, contributing to control virus load (VL). Impact on VL and CD4+ T cell counts of a unique supervised treatment interruption (USTI) coupled with MMF is assessed in a non-randomised controlled study. Il micofenolato mofetil (MMF) è un farmaco immunomodulante comunemente utilizzato nel trapianto di organi solidi. È stato recentemente suggerito che se impiegato in soggetti HIV+, MMF è in grado di ridurre il pool di linfociti CD4+ attivate in attiva fase di replicazione. Obiettivo di questo progetto è valutare l'uso di questo farmaco nel contesto di una singola interruzione di terapia, in soggetti precedentemente trattati durante la fase di infezione acuta primaria. In linea con la tempistica indicata dalle diverse task per il primo anno di studio, il protocollo clinico nucleo del progetto è stato presentato al comitato etico dell'Ospedale San Raffaele, ed ha ricevuto l'approvazione come studio spontaneo interno. In parallelo alle procedure regolatorie, è stato approntato il data base clinico per la successiva elaborazione dei dati. Su un template esistente di cartella clinica computerizzata, è stata definita una scheda di raccolta dati (CRF) specifica per lo studio, al fine di poter riversare direttamente i dati relativi ai parametri clinici e di laboratorio nel data base per la successiva analisi statistica. Il pre-screening dei pazienti afferenti alla Clinica delle Malattie Infettive IRCCS San Raffaele di Milano, effettuato interrogando il data base della clinica, ha consentito di individuare 29 soggetti potenzialmente includibili nello studio. I pazienti eleggibili soddisfano tutti i criteri di inclusioni principali dello studio, in particolare sono stati trattati con HAART durante la infezione acuta primaria, una volta ottenuta la non determinabilità di HIV-RNA nel plasma (20 copie/mL), questa deve essere mantenuta per un periodo  12 mesi, in assenza di blip di viremia. Al gennaio 2005 sono stati arruolati 15 pazienti: il trattamento con HAART dal momento della diagnosi di infezione acuta è stato di 4.9 ± 0.8 (media \pm SD) anni, tutti i soggetti hanno ottenuto una soppressione completa della replicazione di HIV che si è mantenuta tale per 3.6 ± 0.7 anni. Al momento 9 di 15 soggetti hanno iniziato le procedure relative allo studio e sono stati eseguiti i test geno/fenotipici per la definizione del quadro di resistenza farmacologia. Una volta ottenuti i risultati i pazienti inizieranno il periodo di induzione con micofenolato per poi interrompere la HAART. La contemporanea attivazione delle procedure di stoccaggio del materiale biologico, consentirà di avere a disposizione adeguate quantità di campioni per le analisi da effettuarsi negli anni di studio successivi.

Contributo: 30F.48

STUDIO SISTHER

Carlo Torti* (*Università degli Studi di Brescia*); Eugenia Quiros Roldan (*) (*IRCCS S. Matteo, Pavia*); Andrea Antinori (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Michele Magoni (*) (*Ospedale Manzoni, Lecco*); Francesco Mazzotta (*Ospedale S. M. Annunziata, ASL Firenze*); Giuliana Cologni (*) (*Giampiero Carosi (*)*)

Background: Non esistono risultati di RCT che valutino regimi includenti EFV vs LPV/r in pazienti naive. È importante valutare il pattern di resistenza e la risposta a terapie di seconda linea in caso di fallimento di regimi includenti N(t)RTI considerati “NAM-sparing” vs “NAM-provoking” (sequenziamento). Infine, i dati di confronto diretto tra regimi QD e regimi BID risultano ancora limitati.

Metodi: Studio pilota, multicentrico, randomizzato, in aperto. Pazienti naive con CD4+<350/mmc e HIV-RNA>1.000 c/ml sono stati randomizzati 1:1:1 ai seguenti bracci: A=AZT+3TC+LPV/r; B=TDF+3TC+EFV; C=TDF+ddI+EFV. In caso di fallimento (HIV-RNA>50 c/ml alla 28^a settimana ovvero >1.000 c/ml al rebound confermato o tossicità/tollerabilità rilevanti), è previsto switch a terapia alternativa (da A a B/C; da B ad A; da C ad A). A causa di un elevato tasso di fallimento virologico l'arruolamento nel braccio C è stato interrotto. Allo scopo di chiarire le ragioni di tale fallimento, è stata valutata la cinetica (slope) di HIV-RNA (giorni 1, 3, 7, 14, 28), l'outcome viro-immunologico a 28 settimane e i parametri di PK. L'analisi ad interim programmata (braccio A versus B) è stata condotta con approccio ITT sui dati valutabili (10/12/2004).

Risultati: La fase di arruolamento è completa (N=183). Vengono presentati: (a) i risultati viro-immunologici e PK (A versus B versus C); (b) i risultati ad interim dei bracci attivi (A versus B): (a) N=30 (9 braccio A, 10 B, 11 C). Mediana CD4+/mmc (IQR): 218 (65-257) A, 116 (68-160) B, 113 (42-231) C. Mediana HIV-RNA log₁₀ c/ml: 4.43 (3.93-4.97), 4.61 (3.81-4.98), 4.78 (4.36-5.25). Lo slope di HIV-RNA è stato più rapido nel braccio B versus A (coeff. -0.36 log₁₀ c/ml; p<0.0001) e più lento nel braccio C versus B (coeff. 0.37 log₁₀ c/ml; p<0.0001). Il tasso di fallimento alla settimana 28 è stato elevato nel braccio C (4/10 pazienti valutabili) versus A (0/10) e B (1/8). Due pazienti nel braccio C hanno mostrato una risposta subottimale già dal 1° mese (riduzione <1 log₁₀ HIV-RNA c/ml) e mutazioni o sostituzioni nell'RT al basale: 67N+219Q e 210F+215D (non presenti nei pazienti responder). Il pathway di emergenza di resistenze è risultato peculiare: inizialmente 103N, 188L, 190E correlate a NNRTI e infine 65R in tutti i casi. L'AUC mediana (0-24h) [range] di EFV è risultata inferiore nel braccio C, specialmente nei pazienti con fallimento precoce: 22.29 h x mg/l [21.75-37.38] versus B: 68.89 [63.42-84.39]. Tali differenze non sono spiegabili con differenze nell'aderenza terapeutica. (b) Analisi ad interim (N=160; 77 A, 83 B). Media CD4+/mmc (SD): 193 (133); HIV-RNA log₁₀ c/ml: 4.78 (0.84) senza differenze significative tra i due bracci. Le percentuali di HIV-RNA<50 c/ml non sono apparse differenti tra braccio A e B, rispettivamente, alle settimane 4, 16 e 28: 10/68 (14.7%) versus 11/73 (15%); 43/63 (68.2%) versus 42/60 (70%) e 31/35 (88.6%) versus 28/39 (71.8%). I SAE riscontrati nel braccio A sono: N=3 diarrea, 2 anemia, 1 neoplasia. Braccio B: 2 depressione, 1 febbre, 1 vomito, 1 esantema.

Conclusioni: Si conferma il fallimento virologico di TDF+ddI+EFV in pazienti naive. Oltre a considerazioni farmacodinamiche, le possibili cause di fallimento sono: stadio avanzato dell'infezione, mutazioni o sostituzioni nell'RT al basale e ridotte concentrazioni plasmatiche di EFV. L'efficacia di TDF+3TC+EFV è stata rapida e comparabile ad AZT+3TC+LPV/r. L'analisi ad interim non mostra differenze quantitative (bensì qualitative) nella comparsa di SAE tra questi due bracci, il cui follow-up è in corso.

Contributo: 30F.49

EFFETTI INIBENTI DEGLI INIBITORI DELLA PROTEASI DELL'HIV SULLA PROLIFERAZIONE DI LINFOCITI T E SULLA PRODUZIONE DI CITOCHINE

Pier Angelo Tovo* (*Dip. di Scienze Pediatriche, Università degli Studi di Torino*); Emanuela Ricotti* (*Ottavia Delmonte*); Gabriella Bertolotto* (*Andrea Capuano*); Marco Piccinini** (*Dip. di Biochimica, Università degli Studi di Torino*); Maria Teresa Rinaudo (**)

Background: Nonostante alcuni pazienti trattati con HAART presentino una ripresa della replicazione virale, molti mantengono elevati livelli di CD4+ e buone condizioni cliniche. Nostre precedenti indagini avevano documentato un effetto inibente di alcuni antiretrovirali sul proteasoma umano purificato, mentre rimaneva da chiarire se tale azione era condivisa da altri prodotti. I proteasomi svolgono un ruolo cruciale in molte funzioni primarie della cellula. Ad esempio, essi regolano la progressione del ciclo cellulare, l'espressione di recettori di superficie, l'attivazione di fattori trascrizionali NF- κ B ed il suo inibitore I κ B, la produzione di citochine pro-infiammatorie, la processazione e presentazione dell'antigene in molecole MHC di classe I, la reattività dei linfociti T e l'apoptosi. Appare quindi probabile che inibitori del proteasoma alterino tali funzioni.

Metodi: Abbiamo anzitutto esteso la valutazione relativa agli effetti di altri antiretrovirali su proteasomi umani purificati. Abbiamo inoltre studiato la proliferazione cellulare dopo stimolo mitogenico con PHA e anti-CD3, la reazione in colture miste linfocitarie e la sintesi di citochine intracitoplasmatiche su PBMCs di donatori adulti dopo incubazione con antiretrovirali a concentrazioni crescenti. La produzione di tumor necrosis factor- α , interleuchina-2, e interferon- γ da parte delle cellule CD4+ è stata indagata mediante citofluorimetria a flusso dopo stimolazione ottimale con estere del forbolo e calcio ionoforo.

Risultati: Oltre a quanto già osservato per indinavir e ritonavir, anche saquinavir, nelfinavir si sono dimostrati in grado di inibire significativamente l'attività dei proteasomi; tale effetto è assente per i farmaci attivi sulla trascrittasi inversa del virus (Antiv Ther, in stampa). Saquinavir e ritonavir riducono in modo significativo le capacità proliferative dei linfociti T periferici opportunamente stimolati, la risposta allogenica in colture miste linfocitarie e la produzione intracitoplasmatica di IL-2, IFN- γ e TNF- α da parte di PBMCs e soprattutto linfociti CD4+. Il fenomeno è dose dipendente e avviene già a concentrazioni terapeutiche.

Conclusioni: Tutti gli inibitori della proteasi dell'HIV studiati dimostrano di inibire le funzioni dei proteasomi umani purificati. Poiché i proteasomi sono essenziali per la replicazione dell'HIV, parte della loro azione antivirale può quindi derivare da effetti sulle cellule. L'azione sui proteasomi può inoltre giustificare i significativi effetti immunomodulatori sulla proliferazione dei linfociti T, sulle reazioni in colture miste linfocitarie e sulla sintesi di citochine. La minor produzione di citochine che attivano le cellule (e pertanto favoriscono la replicazione del virus), il minor killing specifico e la protezione dall'apoptosi possono contribuire a mantenere un numero elevato di cellule CD4+ in pazienti trattati con insuccesso virologico. I nostri risultati aprono nuove prospettive di impiego degli inibitori della proteasi dell'HIV, ad esempio in patologie caratterizzate da iperattivazione del sistema immunitario, quali malattie autoimmuni o graft versus host cronico, nonché forme proliferative. Studi mirati sono in corso.

Contributo: 30F.50

PREVALENZA, FATTORI DI RISCHIO E STORIA NATURALE DELLA COMPROMISSIONE NEUROCOGNITIVA HIV-ASSOCIATA NELL'ERA HAART

Valerio Tozzi* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Pasquale Narciso (*); Andrea Antinori (*); Pietro Balestra (*); Rita Bellagamba (*); Angela Corpolongo (*); Chrysoula Vlasi (*); Flora Salvatori (*); Simonetta Galgani (*Ospedale San Camillo, Roma*); Patrizia Lorenzini (*); Pierluca Piselli (*); Diego Serraino (*); Giuseppe Ippolito (*)

Background: Non tutti i farmaci antiretrovirali raggiungono il SNC in concentrazioni adeguate. Il SNC potrebbe agire da santuario per la replicazione virale, condizionando non solo l'espressione clinica neurologica ma anche l'evoluzione dell'infezione sistemica. Obiettivi: valutare prevalenza, fattori di rischio, storia naturale, evoluzione a lungo termine e risposta alla terapia HAART del danno neurocognitivo HIV-associato.

Metodi: Studio osservazionale monocentrico, condotto dal 1996 presso l'INMI Spallanzani, Roma. Criteri di inclusione: sospetta compromissione neurocognitiva o grave immunodeficit ($CD4 < 200$). Procedure: a) esame neuropsicologico (17 test neuropsicologici standardizzati); b) esami computerizzati dell'attenzione; c) esame neurologico; d) questionario MOS-HIV; e) RMN cerebrale; f) esame del liquor ove clinicamente indicato. I pazienti sono stati classificati come con o senza compromissione neurocognitiva secondo i criteri dell'AAN.

Risultati: Prevalenza e fattori di rischio (1996-2002) (*JNeuroVirol*, in press). Su 432 pazienti, 238 (55.1%) avevano un danno neurocognitivo HIV-associato che soddisfaceva i criteri dell'ADC nel 10.4%. La prevalenza della compromissione neurocognitiva è rimasta stazionaria nel periodo 1996-2002 ($p=0.86$). I pazienti con compromissione neurocognitiva erano meno giovani (40.4 vs 38.2 anni; $p=0.003$), erano più spesso HCV positivi (61.1% vs 38.9%; $p=0.003$), e avevano un più basso nadir di CD4 (156 vs 222; $p<0.001$). Rispetto al 1996-1999, i pazienti patologici osservati nel 2000-2002 avevano uno stadio CDC meno avanzato (stadio C 28.8% vs 65.7%; $p<0.001$) e un più alto nadir di CD4 (174 vs 132; $p=0.026$). Follow-up e sopravvivenza (submitted). Un HIV RNA stabilmente <80 cp/ml è stato raggiunto dal 49.6% dei pazienti con deficit neurocognitivi e dal 63.3% dei pazienti normali ($p=0.007$). Sono state osservati 47 decessi. La probabilità cumulativa di sopravvivenza a 84 mesi è stata di 68.5% nei pazienti con deficit neurocognitivi e 84.9% nei normali ($p<0.001$). La risposta virologica alla HAART è risultata la variabile più fortemente associata a ridotta sopravvivenza (HR=9.9, 95% CI:3.9-25.0). Dopo stratificazione per risposta virologica, un più elevato rischio di morte per i pazienti con difetti neurocognitivi, aggiustato per i principali fattori confondenti, è stato osservato solo nei 182 pazienti con fallimento virologico (HR:2.8, 95% CI: 1.2-6.8), mentre la probabilità di sopravvivenza nei 230 pazienti con stabile soppressione virologica non è risultato influenzato dalla presenza di compromissione neurocognitiva ($p=0.89$).

Conclusioni: La prevalenza di quadri clinici di danno neurologico HIV-associato è rimasta imm modificata negli anni 1996-2002. Sembrano essere presenti nuovi fattori di rischio (età avanzata, basso nadir di CD4, positività per HCV). Negli ultimi anni di HAART la compromissione neurocognitiva HIV-associata sembra presentarsi in soggetti con malattia meno avanzata e con nadir di CD4 più elevato. La presenza di deficit neurocognitivo si associa sia ad una maggiore probabilità di fallimento virologico alla HAART sia a ridotta sopravvivenza. Dopo aggiustamento per le principali covariate, il rischio di morte del paziente con compromissione cognitiva rimane più elevato solo nei pazienti con fallimento virologico.

Contributo: 30F.51

ALLESTIMENTO E UTILIZZAZIONE DI UN DATABASE MULTICENTRICO ON-LINE COME BASE PER LO STUDIO DELLE FARMACORESISTENZE AGLI ANTIRETROVIRALI

Maurizio Zazzi* (*Università degli Studi di Siena*); Laura Romano (*) (*Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Andrea De Luca (*Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Nicola Gianotti (*Università Vita-Salute, Milano*); Mattia Prosperi (*Università degli Studi di Roma "Tre"*); Carlo Torti (*Università degli Studi di Brescia*); Pier Egisto Valensin (*)

Background: Nonostante l'intenso lavoro prodotto sul tema dalla comunità scientifica negli ultimi anni, molti aspetti della farmacoresistenza agli antiretrovirali sono ancora irrisolti e la valutazione del suo impatto clinico richiede un continuo aggiornamento. Tali difficoltà derivano soprattutto dalla elevata dimensionalità delle variabili in gioco e dal continuo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Metodi: Sulla base dell'attività di genotipizzazione svolta presso il Dipartimento di Biologia di Molecolare dell'Università di Siena come servizio pubblico fin dal 1995, è stato proposto ai centri afferenti a questo stesso laboratorio di integrare l'archivio dei genotipi con i dati clinici dei pazienti (terapia, valori di viremia e di CD4) sia pregressi sia per un periodo di follow-up non inferiore ad un anno dall'ultima genotipizzazione. La proposta è stata poi estesa ad altri centri clinici e annessi laboratori virologici presenti sul territorio nazionale. La finalità dell'iniziativa di centralizzazione dati è stata presentata come base per lo sviluppo di modelli predittivi della risposta al trattamento (progetto genotipo-risposta).

Risultati: Il livello di adesione alla proposta di centralizzazione dati è stato unanime fra i circa 20 centri già serviti dal laboratorio di Siena. L'estensione del progetto ha portato ad oltre 50 le adesioni totali, con quasi 8000 sequenze (3700 pazienti afferenti a 30 centri) già inserite nella banca dati on-line. L'immissione dati da parte di nuovi centri e l'aggiornamento da parte di centri già operativi proseguono, ove possibile mediante lo sviluppo di specifiche routine per il trasferimento da archivi elettronici locali. Il sito del progetto ARCA (Antiretroviral Resistance Cohort Analysis, <https://www.hivarca.net>) è stato avviato nel gennaio 2004 e frequentemente aggiornato anche sulla base delle osservazioni degli utenti. Un prototipo di modello predittivo della risposta al trattamento, derivato dalla precedente attività autonomamente condotta dall'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma e dall'Università Roma Tre, è in corso di ulteriore sviluppo. Oltre supportare questa specifica finalità, a partire da gennaio 2005 il contenuto di ARCA è stato reso disponibile ad iniziative di ricerca nel campo delle farmacoresistenze agli antiretrovirali, sia da parte di centri facenti parte del network sia da parte di richiedenti esterni, previa autorizzazione da parte dei centri proprietari dei rispettivi dati. È stato formato un comitato scientifico responsabile della valutazione scientifica e di fattibilità di tali proposte e sono stati stabiliti i criteri per la rappresentatività dei centri afferenti ad ARCA nelle pubblicazioni derivate. Nell'arco dei primi due mesi di apertura della banca ARCA come strumento di studio sono stati approvati tre studi inerenti (i) la prevalenza e i fattori predittivi della comparsa dei vari pattern mutazionali basati su TAMs, (ii) i fattori predittivi della risposta ad atazanavir, (iii) il ruolo della mutazione M184V nell'evoluzione del genoma virale *in vivo*.

Conclusioni: L'iniziativa di centralizzazione dati ARCA ha avuto una buona adesione. I processi di inserimento e trasferimento dati richiedono risorse adeguate e sviluppo di strumenti dedicati. I ritmi di crescita del database e le sue potenzialità di utilizzazione appaiono decisamente promettenti per tutti gli studi che necessitano di una massa critica di dati.

Contributo: 30F.52

CLINICAL OUTCOME AFTER 4 YEARS FOLLOW-UP IN HIV-SEROPOSITIVE SUBJECTS WITH INCOMPLETE VIROLOGIC OR IMMUNOLOGIC RESPONSE TO HAART

E. Nicastrì* (*IRCCS L. Spallanzani, Roma*); A. Chiesi** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); C. Angeletti* (***); L. Sarmati*** (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); L. Palmisano** (****); A. Geraci** (****); M. Andreoni*** (*****); S. Vella** (****)

Background: The durability of the clinical, virologic and immunologic response to HAART, is not well defined.

Methods: 2,143 patients, enrolled in a longitudinal study, were classified according to the virologic suppression (<500 cp/ml) and the immune recovery (>100 CD4 cells/μl from baseline) at month 12 of HAART as complete responders, virologic only responders, immunologic only responders and non-responders. Kaplan Meyer curves, multivariate and polytomous regression analysis were used.

Results: 781 patients (36.4%) were complete responders, 441 (20.6%) immunologic only responders, 336 (15.7%) virologic only responders, and 585 (27.3%) non-responders. At multivariate analysis, being antiretroviral-naïve increased the probability of having both a virologic only or a complete response and reduced the probability of having an immunologic only response ($p < 0.001$ for all tests). Older age was directly associated with a virologic only response and inversely associated with an immunologic only response ($p = 0.027$ and $p = 0.035$, respectively). At polytomous analysis, patients baseline HIV-RNA level more than 5 log cp/ml had a 1.9-fold higher probability of an immunologic response than of a complete response ($p = 0.001$). After 4 years, the clinical progression rate was 6 times greater for non-responders, 1.9 times greater for virologic only responders and 2.3 times greater for immunologic only responders than for responders. However, patients with virologic only response or with immunologic only response had a significantly reduced risk for clinical progression than non-responders ($p < 0.001$).

Conclusions: After 4 years of HAART, the risk of clinical progression in subjects with immunologic only or virologic only response is low but still higher than in complete responder patients.

IATG: Marani Toro; Osp. Civ., PE - Piazza; Univ. Federico II, NA - Chirianni; Osp. Cotugno, NA - Izzo; Osp. Cotugno, NA - Abrescia; Osp. Cotugno USL 41, NA - Gritti; Osp. Maggiore, BO - Chiodo; Osp. S. Orsola, BO - Magnani; Arcispedale S. Maria Nuova, RE - Ferrari; Osp. Riuniti, PR - Ghinelli; Arcispedale S. Anna, FE - Esposito; Univ. di MO - Ciammarughi; Osp. Infermi, RIMINI - Alberici; Osp. Civile, PC - Zauli; Osp. S. Maria delle Croci, RAVENNA - Aiuti; Pol. Umberto I, Univ. di ROMA - Soscia; Osp. S. Maria Goretti, LT - Bassetti; Osp. S. Martino, GE - Pagano; Osp. S. Martino, GE - Vigevani; Osp. L. Sacco, MI - Santoro; Osp. L. Sacco, MI - Suter; Osp. Riuniti di BG - Scalzini; Presidio Osp. di MN - Rizzardini; Osp. Civile, BUSTO ARSIZIO - Scalise; Osp. Torrette, AN - Pastore; Univ. di BA - Leoncini; Osp. Careggi, FI - Pauluzzi; Pol. Monteluce, PG - Tassara; Osp. Civile, AO - Raise; Osp. S. M. delle Grazie, VE - Vullo; Pol. Umberto I, ROMA - Bellissima; Osp. Gravina, CALTAGIRONE - DeLuca Andreoli; Osp. Regionale Gen., LE - Lauria; Osp. Civile, VASTO - Maio; Osp. Riuniti G. Rummo, BN - Tarquini; Osp. Civile, TE - Petrelli; Osp. Civile di PESARO - Pompei; Osp. Civile Dono Svizzero, FORMIA - Di Toro; U.O. AIDS FONDI - Armignacco; Osp. Infermi, VT - Viganò; Osp. di CUGGIONO - Zuccati; P.O. S. M. Nuova - ASL 10, FI - Paoloni; Osp. Civile, AVEZZANO - Montroni; A. Osp. Umberto I Torrette, AN - Nardi; Osp. Civile di AP - Zacchello; Az. Osp., PD - Terra; Osp. Civile, CROTONE - Stagno; Osp. Bufalini, CESENA - Riccio; Osp. S. Corona, PIETRA LIGURE - Anselmo; Osp. S. Paolo Valoria, SV - Artioli; Osp. Felettino, SP - Cantaluppi; Osp. Maggiore di Lodi, S. ANGELO LODIGIANO - Piacentini; Osp. Predabissi, VIZZOLO PREDABISSI - Resta; Az. Osp. SS. Annunziata, TA - Moise; Az. Serv. San. n. 2 Isontina, GO

Grant: 30F/M

ATTIVITÀ ANTIVIRALI DEI DERIVATI SOLFATATI DEL POLISACCARIDE K5 DI *ESCHERICHIA COLI* QUALI POTENZIALI MICROBICIDI

Tiziana Coradin* (*IRCCS San Raffaele, Milano*); Silvia Ghezzi (*); Debora Pinna (*); Pasqua Oreste (*Glycores2000, Milano*); Elisa Vicenzi (*)

Background: I derivati solfati del polisaccaride K5, espresso sulla parete di un ceppo di batteri *E. coli*, inibiscono l'entrata e replicazione di un ampio numero di isolati di HIV, sia R5 che X4 che R5X4 adattati in laboratorio o primari (E. Vicenzi *et al.*, AIDS 2003). Il primo obiettivo è stato caratterizzarne l'attività virucida in assenza d'interazione dei virioni con la membrana cellulare. Inoltre, sono stati preparati e testati 10 derivati epimerizzati del K5, più simili all'eparina, ma senza attività anticoagulante.

Metodi: Il test di "virion attachment" è stato messo a punto sfruttando la presenza di molecole HLA-DR nei virioni gemmati da linfociti e macrofagi che legano un anticorpo anti-MHC di Classe II adsorbito alle piastre di coltura. I derivati del K5 sono stati aggiunti e successivamente rimossi mediante lavaggio. Il target d'infezione è rappresentato da cellule adese 373 esprimenti CD4, CCR5 o CXCR4 in membrana e trasfettate stabilmente con B-galattosidasi (b-Gal) sotto il controllo di HIV LTR. L'attività B-gal è stata monitorata mediante reazione con il substrato CPRG.

Risultati: Il derivato K5-N,O(H) inibisce sia i virioni X4 che R5. Tuttavia, la dose efficace 50 (IC50) di K5-N,O(H) aumenta di circa 10 volte in seguito a rimozione del composto quando nel test sono stati saggiati virioni X4, mentre gli effetti virucidi di K5-N, O(H) contro virus R5 sono mantenuti anche in seguito alla rimozione del composto (effetto "virocida"). L'epimerizzazione del composto K5-N, O(H) non ha comportato una riduzione della IC50. Tuttavia, è stato identificato un composto epimerizzato [epi-K5-N,O(L)] in grado d'inibire selettivamente l'infezione da virus R5 ma non da virus X4. Sono in corso studi collaborativi con Claudio Vita della CEA per la definizione molecolare dell'interazione tra derivati K5, CD4 e corecettori chemochinici.

Conclusioni: I derivati solfati del K5 agiscono inibendo sia i virioni R5 che X4 indipendentemente, almeno in parte, dall'interazione con la cellule target. L'effetto virucida, oltre agli effetti a largo spettro su virus di diversi clade, li rende quindi maggiormente interessanti candidati allo sviluppo di un microbicide topico atto ad inibire la trasmissione sessuale di HIV.

Contributo: 30F.53

LE CELLULE DENDRITICHE (DC) IN CORSO DI INFEZIONE DA HIV: PDC E MDC CIRCOLANTI ED ATTIVITÀ CITOTOSSICA

Miriam Lichtner* (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Claudia D'Agostino (*); Fabio Mengoni (*); Raffaella Rossi (*); Azzurra Miccoli (*); Francesco Di Campi (*); Anna Paola Massetti (*); Claudio M. Mastroianni (*); Vincenzo Vullo (*)

Background: Le DC circolanti del sangue periferico svolgono un ruolo cruciale nella genesi e nella regolazione della risposta immunitaria naturale e acquisita anti-infettiva e anti-tumorale. Da diversi anni, si è cercato di evidenziare un possibile deficit qualitativo e quantitativo delle DCs nei pazienti in corso di infezione da HIV, arrivando a risultati spesso contrastanti a causa dei problemi tecnici legati allo studio di cellule presenti in maniera così limitata nel sangue periferico. L'obiettivo è stato quello di studiare le popolazioni di DCs mieloidi (mDCs) e plasmocitoidi (pDCs) nei pazienti HIV+, utilizzando una nuova metodologia Tru-Count. È stato inoltre valutato se nell'infezione da HIV le DCs acquisiscano una funzione citotossica e se questo possa rivestire un ruolo patogenetico nella deplezione linfocitaria tipica della malattia da HIV.

Metodi: Sono stati analizzati 58 soggetti HIV+ e 31 donatori sani. È stata messa a punto una metodica di conta assoluta delle due sottopopolazioni di DCs del sangue. Il metodo prevede l'utilizzo di sangue intero ed un'analisi citofluorimetrica per eventi rari in 4 colori con tubi truocount (Becton Dickinson) contenenti un numero noto di biglie di riferimento. Il modello sperimentale per studiare l'effetto citotossico ha previsto l'utilizzo delle DCs derivate dai monociti (MDC) infettate con 2 differenti ceppi di HIV; come target sono state testate la linea cellulare dell'adenocarcinoma mammario MDA-231, le linee T CD4 H9 e H9V3 latentemente infettate da HIV e linfociti CD4 primari.

Risultati: I dati mostrano che nei soggetti HIV+ il numero di entrambe le sottopopolazioni di DCs era significativamente diminuito rispetto ai controlli sani (mDCs: $p=0.001$; pDCs: $p=0.0001$). Al fine di valutare il ruolo di tale deficit nella storia naturale della malattia sono stati individuati 22 pazienti naive, di cui 12 definiti non progressors e 10 progressors. Questi ultimi presentano dei valori di mDCs e pDCs (mediana 2679 cell/ml; range 444-10959 e 1084; 60-1591 rispettivamente) estremamente ridotti e significativamente più bassi rispetto a quelli dei non progressors (mDCs: 10833; 5996-48141; pDCs: 5237; 1504-17795). In questi soggetti è stata evidenziata una correlazione negativa tra valore di pDCs o di mDCs e HIV-RNA ($p=0.0067$ e $p=0,024$, rispettivamente). Nella maggioranza dei pazienti era presente inoltre una correlazione positiva con i CD4+. In alcuni soggetti, invece si è potuto descrivere una dissociazione tra numero di CD4 e valore di pDCs. È emerso come proprio in questi pazienti il basso numero di pDCs (<3000) si associava ad un successivo decremento dei CD4 e/o un aumento di HIV-RNA. Per quanto riguarda la citotossicità è stato dimostrato come le cellule dendritiche infettate da HIV sviluppano una attività citotossica antitumorale e la capacità di indurre apoptosi nei linfociti T CD4+ infettati.

Conclusioni: Lo studio delle DC circolanti mediante conta assoluta su sangue intero permette di effettuare una valutazione immunologica aggiuntiva alla conta dei CD4. Tale valutazione appare particolarmente utile in quei pazienti naive in cui la progressione della malattia in termini di HIV-RNA e di CD4 non è ancora manifesta. L'induzione della citotossicità nelle DCs da parte di HIV, potrebbe contribuire alla deplezione associata all'HIV delle cellule T, attraverso l'induzione dell'apoptosi, specialmente nelle fasi precoci dell'infezione.

Contributo: 30F.55

Progetto
Coinfezioni, infezioni opportunistiche
e tumori associati all'AIDS

Responsabili scientifici
Prof. Antonio CASSONE e Prof. Luigi ORTONA

RISPOSTA AD HAART E COINFEZIONI DA GBV-C ED HCV IN UNA COORTE DI PAZIENTI CON INFEZIONE DA HIV

Giorgio Antonucci* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Maria Rosaria Capobianchi (*) ; Antonella D'Arminio Monforte (*Clinica delle Malattie Infettive, Università degli Studi di Milano*); Massimo Puoti (*Clinica delle Malattie Infettive, Università degli Studi di Brescia*); Cosmo Del Borgo (*) ; Ubaldo Visco Comandini (*) ; Isabella Abbate (*) ; Fabrizio Carletti (*)

Background: La terapia HAART ha criticamente modificato la storia naturale di HIV aumentando la sopravvivenza complessiva e riducendo le patologie opportunistiche. Di recente stanno emergendo dati che suggeriscono complesse interazioni tra HIV, HCV e GBV-C, tali da modificare la storia naturale delle diverse infezioni. Gli obiettivi di questo studio mirano a chiarire gli effetti dei livelli di viremia e dei genotipi HCV e della viremia GBV-C sulla progressione clinica e sulla risposta immunologica e virologica conseguente all'inizio di HAART.

Metodi: La popolazione dello studio è costituita da pazienti che hanno iniziato HAART come primo regime antiretrovirale arruolati nella Coorte I.Co.N.A. Lo studio è multicentrico, prospettico, osservazionale. I dati relativi a positività anticorpale HCV e presenza di HbsAg, le determinazioni di HIV RNA e dei CD4+ sono state fornite dal data-base della coorte. La carica virale, il genotipo di HCV e la viremia GBV-C sono stati determinati su campioni di plasma, conservati a -80°. HCV-RNA è stato misurato mediante Quantiplex HCV RNA Ultrasensitive vers. 3.0 (Bayer Diagnostics). Nei soggetti con HCV-RNA negativo (<521 IU/mL), la viremia è stata determinata con saggio TMA (Bayer Diagnostics, sensibilità =5 IU/mL). Il genotipo di HCV è stato determinato con test InnoLipa HCV II (Bayer Diagnostics). Per viremia GBV-C si è utilizzata una amplificazione RT-PCR, mediante primer 5'UTR. Il tempo per il raggiungimento del successo virologico (HIV RNA <500 cp/ml), immunologico (incremento CD4+ >100/mm³) e del relapse virologico (HIV RNA confermato >500 cp/ml) sono stati valutati mediante metodo di Kaplan-Meier e modello di regressione lineare di Cox.

Risultati: Per l'effetto della viremia HCV su HAART l'analisi ha coinvolto 1219 soggetti HCV-Ab negativi e 284 HCV viremici. La probabilità di recupero immunologico è risultata inferiore nei soggetti viremici (RH aggiustato=0,82; 95% IC:0,66-1,01; p=0,06). Tale recupero non è tuttavia correlato al livello di viremia HCV (RH aggiustato=0,97; 95% IC:0,75-1,27; p=0,83 comparando pazienti >1,000,000 IU/mL con quelli con livello di 5-1,000,000 IU/mL). Inoltre non è stato possibile rilevare alcuna definita relazione tra genotipi HCV e recupero di CD4+. L'effetto di GBV-C su HAART è stato valutato su 400 soggetti, di cui 117 (29,3%) GBV-C positivi; di questi 351 hanno ottenuto un successo virologico. Dopo aver controllato per numerosi "confondenti" tra cui viremia HCV, i pazienti GBV-C viremici hanno mostrato una probabilità di relapse virologico significativamente minore rispetto ai non viremici (RH aggiustato=0,56; 95% IC:0,34-0,93; p=0,03). Al contrario la probabilità di raggiungere un iniziale successo virologico o immunologico non è risultata modificata dalla presenza di viremia GBV-C.

Conclusioni: I risultati di questo studio suggeriscono una diretta implicazione della viremia HCV nel condizionare sfavorevolmente la risposta immunitaria ad HAART. Si sottolinea, quindi, come nei pazienti con coinfezione HIV/HCV l'obiettivo della terapia anti-HCV sia l'eradicazione di questo virus per rallentare la progressione della malattia epatica e limitarne le potenziali interferenze sulla risposta ad HAART. Infine i nostri risultati suggeriscono che GBV-C può giocare un ruolo nel determinare il tasso di relapse virologico dopo HAART, probabilmente mediante un meccanismo di competizione con la replicazione di HIV.

Contributo: 50F.1

MECCANISMI DI FARMACORESISTENZA IN CEPPI DI *CANDIDA ALBICANS* ISOLATI DA PAZIENTI HIV-POSITIVI ED IN CEPPI CON RESISTENZA SPERIMENTALMENTE INDOTTA

A. Stringaro* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); L. Angiolella** (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); A. Molinari (*); L. Toccaceli (*); M. Colone (*); P. Crateri (*); C. Testa (**); M. A. Bonito (**); F. De Bernardis (*); M. Cianfriglia (*); A. T. Palamara (**); A. Cassone (*); G. Arancia (*)

Background: Nostri precedenti studi hanno dimostrato la presenza di una molecola simile alla P-glicoproteina (Pgp) umana, nota molecola di trasporto dei farmaci coinvolta nella polifarmacoresistenza delle cellule tumorali, in ceppi di *Candida albicans* e che l'espressione di tale molecola è correlata al grado di resistenza agli azoli. Tale risultato è stato ottenuto sia su ceppi farmacoresistenti isolati da pazienti HIV-positivi, sia su ceppi isolati da pazienti con vaginite ricorrente, resi resistenti *in vitro* mediante ripetuti passaggi in presenza di fluconazolo. Quindi, una delle principali cause della resistenza in *C. albicans* potrebbe essere l'alterato accumulo ed efflusso del farmaco dovuto all'attivazione di geni codificanti per alcune proteine di trasporto. Inoltre, è stato recentemente suggerito un ruolo delle proteine parietali nell'acquisizione della resistenza ai farmaci. Allo scopo di chiarire i meccanismi molecolari alla base del fenomeno della polifarmacoresistenza in ceppi di *C. albicans* isolati da pazienti HIV-positivi e di suggerire modalità di trattamento innovative efficaci nei confronti delle micosi resistenti, è stato studiato il ruolo delle proteine di trasporto e delle proteine parietali in ceppi di *C. albicans* con resistenza intrinseca, sperimentalmente indotta e isolati da pazienti HIV-positivi.

Metodi: L'espressione e la localizzazione delle proteine di trasporto in ceppi resistenti e sensibili è stata studiata mediante citofluorimetria e immunomicroscopia elettronica su sezioni di cellule fissate ed incluse e su criosezioni. Sono stati eseguiti l'isolamento, la purificazione e la caratterizzazione biochimica della proteina mannosilata, beta 1-3 glucanasi. È stata eseguita l'analisi ultrastrutturale mediante microscopia elettronica delle modificazioni della parete cellulare del microrganismo.

Risultati: Le osservazioni eseguite mediante immunomicroscopia elettronica su criosezioni di cellule resistenti e sensibili agli azoli hanno confermato la correlazione tra espressione di una molecola simil-Pgp umana e grado di resistenza. È stato inoltre valutato l'effetto del micafungin (FK 463), un lipopeptide il cui bersaglio specifico è la 1,3-beta-D-glucon sintetasi, la cui inibizione causa l'arresto della sintesi del 1,3-beta-glucono, un componente essenziale della parete cellulare. Le osservazioni di microscopia elettronica sul ceppo CO23 sensibile hanno mostrato cellule con una tipica morfologia di superficie ed una normale organizzazione delle strutture subcellulari. Al contrario, le cellule del ceppo CO23 resistente all'FK 463 presentavano significative alterazioni morfologiche, quali aumento delle dimensioni e la formazione anomala dei setti di divisione. Inoltre, l'analisi delle sezioni ultrasottili delle stesse cellule ha rivelato la presenza di importanti alterazioni dell'organizzazione della parete cellulare di *C. albicans*, soprattutto a livello dello strato parietale elettron-trasparente, costituito quasi esclusivamente da glucono.

Conclusioni: I risultati ottenuti, oltre a confermare la presenza di molecole di trasporto nelle *Candide* farmacoresistenti, suggeriscono fortemente che il danno indotto dall'FK 463 sulla normale organizzazione e costituzione della parete cellulare del ceppo resistente comporti soprattutto l'alterazione nella distribuzione di alcuni componenti glicosilati della parete cellulare.

Contributo: 50F/A

L'ATTIVAZIONE DELL'INTEGRINA ALFA5/BETA1 SENSIBILIZZA IL RECETTORE TIROSINA CINASI TIE-2 E POTENZIA L'EFFETTO ANGIOGENICO DI ANGIOPOIETINA-1

Ilaria Cascone* (*Dip. di Scienze Oncologiche, Università degli Studi di Torino*); Lucia Napione (*); Fabrizio Maniero (*); Federico Bussolino (*)

Background: Il sarcoma di Kaposi(KS) è una malattia angioproliferativa multifocale. In occidente l'incidenza del KS epidemico è riduzione, fatta eccezione per pazienti omosessuali ed è correlata al successo della terapia HAART(Cancer 2004, 100:2644). Infatti tale riduzione non è osservabile nei paesi in via di sviluppo(Curr Op Oncol 2004,16:468). La fase di progressione dell'angiogenesi in KS è ben studiata, mentre poche sono le informazioni inerenti le molecole che stabilizzano i vasi quali le angiopoietine (Ang). Ang1 e Ang2 rispettivamente attivano e inibiscono il recettore Tie2. Tie-2 è overespresso nel KS e Ang2 è presente nel siero di pazienti con KS epidemico(Nat Gen 2004, 36:687). In questo lavoro abbiamo studiato i meccanismi molecolari in endotelio isolato da KS con cui Ang1 attiva Tie2 dimostrando che l'attivazione da parte di fibronectina (FN) dell'integrina alfa1/beta5(a5/b1), anch'essa overespressa nel KS (Nat Gen 2004, 36:687), sensibilizza Tie2 e le attività biologiche di Ang1.

Metodi: Sono state studiate EC da grossi vasi, da lesioni di KS (EC-KS) e da cute (EC-Sk). Le cellule sono state piastrate su diverse matrici extracellulari e con tecniche di immunoprecipitazione, immunoblot e saggi enzimatici è stata studiata l'attivazione di Tie2 ed effettori a valle. Le attività biologiche studiate sono state la sopravvivenza, la motilità l'adesione cellulare e *in vivo* l'angiogenesi utilizzando la membrana corion allantoidea di pollo(CAM).

Risultati: Parte di Tie2 associa costitutivamente ad a5/b1, ma non ad altri complessi. Questi risultati sono stati ottenuti in 3 tipi cellulari e convalidati utilizzando fibroblasti knock-out per a5, in cui non si è osservata tale associazione, che è stata ripristinata trasferendo le cellule con a5. L'associazione non modifica l'attività catalitica né proprietà biologiche attivate da Ang1 quando le cellule sono piastrate su collagene I, laminina o vitronectina. L'attivazione dell'integrina da parte del suo ligando FN o da Ab attivanti la sub-unità b1 induce una sensibilizzazione del recettore spostando a destra la curva dose-risposta in termini di autofosforilazione di Tie2, di sopravvivenza cellulare e di motilità indotte da Ang1. L'effetto è presente su tutti e 3 i tipi cellulari, ma le EC-KS presentano un ulteriore spostamento a destra di tali curve(Ang1 EC50. EC-Sk, su collagene: 100 ng/ml; su FN: 25 ng; EC-KS, su collagene: 100 ng/ml; su FN: 5 ng;). L'analisi quantitative sia a livello di mRNA che di proteina dimostra che la quantità di Tie2 è simile in EC-KS ed EC-Sk, ma quella di a5 e b1 è di almeno 2 volte superiore nelle EC-KS, suggerendo che più a5/b1 è disponibile per Tie2 aumentando la quota attivabile. FAK e la fosfatidilinositolo3-cinasi sono reclutati dal complesso Tie2/a5/b1, ma la loro attivazione dipende esclusivamente da Ang1. Inoltre abbiamo osservato che Ang1 lega indipendentemente da Tie2 l'integrina a5/b1 attivando FAK. La specificità di questo sistema è convalidato da esperimenti in CAM che dimostrano che Ab bloccanti a5/b1 ma non av/b3 inibiscono l'attività angiogenica di Ang1.

Conclusioni: Questi dati suggeriscono importanti potenzialità patogenetiche del sistema Tie2/Ang nell'angiogenesi associata a KS in cui l'integrina a5/b1 è overespressa e rappresentano la base concettuale per l'utilizzo di inibitori di Tie2 (Cancer Biol Ther. 2003, 2:S127)nell'angiogenesi del KS.

Contributo: 50F.2

I LINFOMI KSHV/HHV8-ASSOCIATI POSSONO ASSUMERE DUE FORME: L'EFFUSIONE LINFOMATOSA E LA FORMA "SOLIDA", INDIPENDENTEMENTE DALL'INFEZIONE DA HIV

Antonino Carbone (*Istituto Nazionale Tumori, Milano*); Annunziata Gloghini (*Centro di Riferimento Oncologico, Aviano*)

Background: È stato dimostrato che KSHV/HHV8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus type 8) è associato, oltre al sarcoma di Kaposi (KS), a tre disordini linfoproliferativi che insorgono prevalentemente in pazienti con infezione da HIV/AIDS: il "body cavity based-lymphoma"/"primary effusion lymphoma" (BCBL/PEL), la malattia di Castleman multicentrica (MCD) ed il linfoma plasmoblastico associato a MCD. I linfomi KSHV/HHV8-associati, che si sviluppano frequentemente in pazienti HIV-infetti con AIDS, possono presentarsi come effusioni linfomatose primarie (PEL) o, meno frequentemente, come linfomi "solidi" extracavitari. Questi ultimi linfomi, noti anche come "PEL solidi", sono stati riportati sia prima che dopo lo sviluppo di un'effusione linfomatosa. Recentemente, KSHV/HHV8 è stato rinvenuto mediante PCR e/o immunocitochimica anche in casi di linfoma che si presentavano come masse tissutali in pazienti con MCD o KS AIDS-associati. Questi linfomi sono stati descritti istologicamente come linfomi diffusi a grandi cellule a fenotipo B (DLBCL) o come linfomi immunoblastici con morfologia simil-PEL.

Metodi: Recentemente abbiamo osservato, in pazienti HIV-seropositivi, tre casi di linfoma KSHV/HHV8-associati che si presentavano come lesioni "solide" o extracavitari in assenza di effusione, generalmente senza altre malattie KSHV/HHV8-associate. Ancora più recentemente abbiamo registrato evidenza dell'esistenza, in due pazienti HIV-seronegativi, di un nuovo tipo di linfoma KSHV/HHV8-associato senza effusione linfomatosa, non descritto in precedenza. Tutti i cinque casi sono stati studiati in funzione delle loro caratteristiche cliniche, morfologiche, fenotipiche, virologiche e genetico-molecolari.

Risultati: I linfomi analizzati esibivano una predilezione per i linfonodi e mostravano una morfologia simil-immunoblastica o a grandi cellule anaplastiche. Questi tumori erano inequivocabilmente privi dei comuni marcatori specifici per tipi cellulari distinti, compresi i marcatori epiteliali e melanocitari. Gli antigeni B- e T-associati e gli altri marcatori linfoidi comunemente usati erano assenti o debolmente espressi da una frazione di cellule tumorali. Per contro, studi immunocitochimici hanno dimostrato intensa positività per i marcatori plasmocellulari in tutti i casi analizzati. Infezione da EBV era presente in tre dei cinque linfomi. In tutti i cinque casi, le cellule tumorali mostravano espressione di un set di geni caratterizzanti specificamente il profilo genico delle cellule tumorali di PEL.

Conclusioni: Sulla base delle caratteristiche morfologiche e fenotipiche, queste neoplasie a grandi cellule sono state definite come linfomi KSHV/HHV8-associati a grandi cellule con morfologia immunoblastica e/o anaplastica e immunofenotipo plasmoblastico. Da un punto di vista classificativo, questi linfomi possono corrispondere ad entità distinte comprese nell'ambito del gruppo eterogeneo dei DLBCL con differenziazione plasmoblastica. Poiché gli aspetti biopatologici dei linfomi "solidi" KSHV/HHV8-associati mimano molto da vicino quelli manifestati dai PEL, i nostri risultati suggeriscono che i linfomi "solidi" KSHV/HHV8-associati possono rappresentare una variante tissutale dei PEL classici, indipendentemente dall'infezione da HIV. L'analisi dell'infezione virale e studi immunocitologici sono di primaria importanza nel riconoscere e definire i linfomi "solidi" o extracavitari KSHV/HHV8-associati, in particolare quelli che insorgono in pazienti HIV-seronegativi senza effusione.

Contributo: 50F.3

INTERAZIONE PROTEASOMA/LPV

Elisa Tronconi* (*Ospedale L. Sacco, Milano*); Antonella Valerio (*); Francesca Mazza (*); Antonietta Cargnel (*); Chiara Atzori (*)

Background: L'effetto inibitorio dei PIs sulla crescita di *Pneumocystis* (Pc) può essere correlato a una modulazione del proteasoma (PS), complesso enzimatico presente in tutte le cellule eucariotiche con ruolo centrale nella degradazione delle proteine (microrganismo/ospite). Isolamento e studio dell'attività del PS in presenza di LPV, ATV e di un inibitore peptidomimetico delle aspartil-proteasi, TS98, efficace sulla proteasi di HIV-1 e sulla SAP-2 di *Candida albicans*. Attività del PS di due linee cellulari implicate nella risposta immunitaria, Jurkat (linfoblasti) e U937 (monociti), in presenza di LPV e ATV.

Metodi: Mantenimento Pc nel ratto immunodepresso, fonte di trofozoiti, infezione di HEL 299 per la coltura temporanea *in vitro*, in presenza di 5-1-0.1 µg/mL di TS98. Dopo 1, 3, 5, 7 gg, curve di crescita, statistica ANOVA a 2 vie e Bonferroni come test post-hoc. Controlli: non trattato e TMP/snz 250 µg/mL PS di Pc e sua modulazione da parte di LPV. Espansione Pc in coltura intensiva (spinner flask), lisi. Elettroforesi in condizioni non-denaturanti del sovratanante, saggio attività con peptide fluorogenico Suc-LLVY-AMC specifico per l'attività chimotripsino-simile 20S. Bande excise su SDS-PAGE. Saggio spettrofluorimetrico sull'attività con substrato controllo con Lactacistina 10 µM, inibitore selettivo del PS, in presenza e assenza di LPV (10,5 µg/mL) PS di HEL299, Jurkat e U937. Estrazione secondo Groettrup. Test di attività del PS su cellule intere con MeO-Suc-GLF-AMC. Incubazione a 37°C con LPV 0.1, 0.5, 5 e 10 µg/mL, ATV 0.01, 0.1 e 1 µg/mL. Controllo: Lactacistina 30 µM. Dopo 1, 4, 8 gg lettura (λ_{ec} = 360nm; λ_{em} = 465nm) in piastre multi well dopo 30, 45, 60 e 75 min con substrato. Statistica: test ANOVA2 Bonferroni come test post-hoc. Incubazione: 6h (Jurkat) e 2 gg (U937).

Risultati: Inibizione crescita Pc con TS98 (t7) 52-65%, non dose-dipendente. Prima dimostrazione del PS di Pc. Nel saggio fluorimetrico in presenza di LPV, alle concentrazioni raggiungibili nella pratica clinica, progressiva inibizione dell'attività peptidasi. PS delle HEL299 isolato e purificato con successo. Test di attività su cellule intere: HEL299 inibizione significativa ($p<0.05$) dell'attività del PS con LPV, induzione con ATV ($p<0.01$) non più rilevabile al giorno 8. Linee linfo-monoblastoidi: con LPV inibizione ($p<0.05$) dell'attività peptidasi, con ATV 1 µg/mL attivazione ($p<0.001$).

Conclusioni: L'inibizione aspecifica di TS98 su Pc conferma risultati di studi precedenti con per le quali è già stata dimostrata un'attività anti OI *in vitro*, offrendo una possibile strategia per la messa a punto di nuove terapie. Nel PS di tutte le linee cellulari e di Pc l'attività chimotripsino-simile 20S era significativamente modulata da LPV, indicando un'attività aspecifica inaspettata. Questa osservazione permette di ipotizzare che i risultati ottenuti precedentemente negli studi farmacologici *in vitro*, esprimono la correlazione tra inibizione della crescita del microrganismo e modulazione del PS. Su HEL299 medesimo andamento: l'effetto farmacologico dei PIs su Pc può essere anche dovuto alla modulazione del PS della cellula ospite in aggiunta all'effetto diretto sul microrganismo. Il meccanismo di interazione tra substrato cellulare e Pc rimane da determinare. I risultati ottenuti nelle linee linfo-monocitarie dimostrano l'effetto di LPV su PS di cellule umane coinvolte nella risposta immunitaria, con possibile influenza su numerosi aspetti virologici (presentazione dell'antigene, assemblaggio, gemmazione e rilascio delle particelle virali) e perciò meritevole di ulteriore approfondimento.

Contributo: 50F.4

HUMAN HYPERVARIABLE ANTIBODY DOMAINS RECOGNIZING VIRULENCE TRAITS OF *CANDIDA* *ALBICANS* CONFER PASSIVE PROTECTION AGAINST EXPERIMENTAL VAGINAL CANDIDIASIS

Silvia Bartolini* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Silvia Sandini (*); Roberto La Valle (*); Flavia De Bernardis (*); Antonio Cassone (*); Haiqun Liu** (*Domantis, Cambridge, UK*); Steve Grant (**); Rachel O'Mahony*** (*UCL, Guy's Hospital, London, UK*); John Holton (***) ; Ivan Roitt (***)

Background: In the context of immunotherapy of human mucosal candidiasis, the generation of humanized or human antibodies is a critical issue that has recently become more affordable by the use of recombinant DNA technology. In particular, phage expression libraries allow selection and production of human single chain-variable fragments (scFv) or hypervariable single domain antibodies (dAbs) with predefined specificity, in relatively large amount and readily standardizable. We have already reported examples of therapeutic anti-Candida scFv applications (Beninati *et al.* Nat. Biotech. 18, 1060,2000) but, to our knowledge, no human anti-Candida dAbs have ever been generated or utilized. We have here studied generation, specific binding and efficacy in an *in vivo* candidiasis model of dAbs reacting with the Sap2 and MP65 proteins of *C. albicans*, i.e. two critical virulence traits (adhesins) of the fungus. Single variable domains (dAbs) were generated from phage libraries based on a single human antibody framework for VH (V3-23 [locus] DP47 [V Base entry] and JH4b) and for VL (012/02 [locus] DPfÙ9 [V Base entry] and JfÙ1) with suitable diversity. The dAb variable domains were cloned into the phage vector pDOM4 which is based on the fd-phage genome and therefore contains all the necessary phage genes to produce infective phage particles used during the selection process. dAbs were selected by phage display on recombinant Sap2 and MP65, which were obtained and purified as previously reported (La Valle *et al.* Infect. Immun. 68, 6777,200) Estrogen-induced rat vaginitis was used as a model of mucosal Candida infection (Cassone *et al.* J. Infect. Dis. 185,188,2002). Ten unique MP65 specific binders (3 VH and 7 VK) and 27 unique SAP2 specific binders (22 VH and 5 VK) were identified. Two Sap2 dAbs and 3 MP65 dAbs were further selected on the basis of their capacity to inhibit adherence of fungal cells to plastic and vaginal epithelium as well as enzymatic activity (for Sap2). These five dAbs showed different degree of accelerated clearance and cure of mucosal candidiasis. dAbs therapeutic effects equalled those of potent triazole antifungals in this model but antimycotic resistant strains of *C. albicans* were also potentially inhibited. At least for Sap2, the therapeutic effect *in vivo* paralleled inhibition of enzymic activity. MP65 and Sap2-binders were inhibitory for Candida adhesion to epithelial cells but only MP65 binders were also inhibitory of Candida adhesion to human endothelial cells (HUVEC). Overall, our data establish that human antibody fragments with a single variable domain are potent therapeutics in an experimental mucosal infection closely mimicking human vaginal candidiasis. They also suggest that adhesion inhibition mechanisms play a role in this therapeutic effect.

Grant: 50F/B

EFFETTI DI COMBINAZIONI DI FARMACI ANTIRETROVIRALI ED ANTIMALARICI SULLA REPLICAZIONE DI HIV-1 E SULLA CRESCITA DI *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Andrea Savarino* (*Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Anna Sannella** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Barbara Lucia Mothanje (*) ; Elena Rastrelli (*) ; Roberta Spaccapelo*** (*Università degli Studi di Perugia*); Mario Dell'Aglio^o (*Università degli Studi di Milano*); Germana Galli (^o); Enrica Bosisio (^o); Tania Dottorini (***) ; Andrea Crisanti (***) ; Carlo Severini (**); Giancarlo Majori (**); Antonio Cassone (**); Roberto Cuda (*)

Background: HIV/AIDS e malaria affliggono pesantemente regioni geograficamente sovrapponibili; ad oggi tuttavia ancora poco si conosce del trattamento simultaneo di entrambe queste malattie. Sebbene abbia una minima attività anti-HIV-1, l'antimalarico chinolinico cloroquina esercita effetti anti-HIV-1 in maniera sinergistica in combinazione con indinavir, ritonavir e saquinavir [Savarino *et al.* JAIDS 2004]. Questo studio è finalizzato alla ricerca di un target per gli inibitori della proteasi di HIV (IP) in *Plasmodium falciparum* ed alla determinazione degli effetti combinati anti-HIV-1 ed antiprotozoi degli antimalarici chinolinici e degli IP.

Metodi: Gli allineamenti strutturali ed il docking proteina/ligando sono stati calcolati mediante un programma bioinformatico. L'attività della plasmepsina IV (PMIV) è stata valutata spettrofotometricamente. La vitalità di *P. falciparum* e la replicazione di HIV-1 sono state misurate mediante tecniche standard. Gli effetti delle combinazioni di farmaci sono stati analizzati mediante la somma delle concentrazioni di inibizione frazionate (SFIC). La fusione di HIV-1 è stata quantificata con l'osservazione della formazione di sincizi nelle co-culture di cellule H9IIIB/MT2.

Risultati: È presente una similarità strutturale significativa tra la proteasi di HIV-1 e le proteasi aspartiche di *P. falciparum*, conosciute come plasmepsine ($P < 0.001$), che permette ai PIs di stabilire legami idrogeno nel sito attivo della PMIV. I diversi PIs inibiscono in maniera dose-dipendente PMIV e riducono la vitalità di ceppi di plasmodio sensibili e resistenti alla cloroquina *in vitro*. Inoltre gli IP mostrano effetti sinergistici in combinazione con gli antimalarici chinolinici (SFIC < 0.5). L'IP ritonavir e la combinazione ritonavir/lopinavir (Kaletra) aumenta la sopravvivenza di topi infettati con *P. berghei* (Kaplan Meyer; $P < 0.01$).

Conclusioni: La combinazione dei PIs e degli antimalarici chinolinici potrebbe rappresentare la base per strategie terapeutiche per combattere simultaneamente HIV/AIDS e malaria.

Contributo: 50F.5

TRATTAMENTO DELL'INFEZIONE DA HCV NEI PAZIENTI CON CO-INFEZIONE HCV/HIV IN TERAPIA ANTIRETROVIRALE TOLLERABILITÀ, EFFICACIA ED IMPATTO SUI PARAMENTRI IMMUNOVIROLOGICI DI DIVERSE STRATEGIE A CONFRONTO

Andrea De Luca* (*Malattie Infettive, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Antonella Cingolani (*); Simona Di Giambenedetto (*); Enrica Tamburrini (*); Roberto Cauda (*)

Background: Scopo di questo studio è quello di valutare sicurezza ed efficacia di una temporanea interruzione controllata della terapia antiretrovirale nel migliorare la tollerabilità della terapia combinata anti-HCV.

Metodi: Studio di intervento randomizzato in aperto in pazienti in terapia antiretrovirale in corso o pregressa con CD4>350, HCV-RNA positivi con presenza di fibrosi epatica. I pazienti eseguono peginterferone alfa 2a o 2b ai dosaggi raccomandati +ribavirina 800-1200 mg/die in base al peso per >24-48 settimane e vengono randomizzati 2:1 ad una prosecuzione/ripresa della terapia antiretrovirale (on ARV) o alla interruzione/prosecuzione della sospensione (off ARV) pianificando una ripresa se CD4<250, senza ulteriori interruzioni. L'end-point principale dello studio è la proporzione pazienti in grado di completare il trattamento con PEG-IFN + ribavirina; end-point secondari: proporzione di pazienti con tossicità clinica o di laboratorio, modificazioni dei CD4 e di HIV RNA; proporzione di risposte virologiche sostenute alla terapia anti-HCV.

Risultati: L'arruolamento, in corso, vede al momento 43 pazienti (16 off ARV e 27 on ARV). Le caratteristiche principali al BL sono: età media 42 anni, 72% maschi, 65% TD, valore medio dei CD4 581 cell/mmc (range 361-1176), di HIV RNA 2.55 log₁₀ copie/ml (1.69-4.95), di HCV RNA 5.85 log₁₀ UI/ml (4.00-6.50), di ALT 88 (19-583) UI/ml, di stadio della fibrosi 2 (1-4); il 51% presentava genotipi di HCV 1 o 4, il 49% genotipi 2 o 3. Le caratteristiche basali erano omogenee nei due gruppi di randomizzazione con l'eccezione dell'Hb, significativamente inferiore (p=0.024) e di VL, superiore (p=0.032) nel braccio off ARV. End-point principali: 22 interruzioni premature della terapia anti-HCV (51%), (15/27, 56%, nel braccio on ARV, 7/16 (44%) nel braccio off ARV, p=0.45). 14 (33%) interruzioni per tossicità (9/27 casi vs 5/16, p=ns). End-point secondari. Non si sono verificati eventi clinici. Si è osservata una differenza significativa di HIV RNA tra i due bracci a 4 settimane (cambiamento medio dal basale +1.17 log rispetto a -0.23 log, p=0.012) ed un trend a 24 settimane (+0.57 log vs -0.11 log); il numero assoluto dei CD4 ha mostrato un trend per una maggiore riduzione nel braccio off ARV a 4 settimane (cambiamento medio del numero assoluto dal basale -183 cell/mmc vs -84, p=0.12), ma non a 12 e 24 settimane; il cambiamento della percentuale dei CD4 dal basale era significativamente più negativo nel braccio off ARV a 24 settimane (cambiamento medio dal basale -3% vs +3%, p=0.009). Le modifiche di HCV RNA dal basale a 4, 12 e 24 settimane (per protocollo) non mostravano significative differenze tra gruppi. La proporzione di SVR (analisi ITT di pazienti che hanno raggiunto il FU) era pari a 40% nel braccio off ARV e 25% nel braccio on ARV (p=0.17). L'analisi dei predittori di interruzione prematura della terapia anti-HCV (regressione logistica multivariata) ha mostrato che l'impiego di d4T nella ARV basale risultava associata ad un maggiore rischio di interruzione, mentre i valori di piastrine, di ALT ed il genotipo di HCV 2 e 3 risultavano associati ad un minore rischio. L'impiego di d4T risultava essere l'unico predittore indipendente di interruzione prematura della terapia anti-HCV per tossicità.

Conclusioni: Dall'analisi dei primi dati non emergono dunque problematiche connesse alla sicurezza del protocollo.

Contributo: 50F.6

ISOLAMENTO E PROPAGAZIONE *IN VITRO* DI HHV8

Paola Gasperini* (*Dip. di Scienze Oncologiche e Chirurgiche, Sezione di Oncologia, Università degli Studi di Padova*); Giulia Masserizzi (*); Massimo Barbierato (*); Canio Martinelli** (*Unità Operativa di Malattie Infettive, Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze*); Iole Maria Di Gangi (*); Paolo Rigotti (*Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Padova*); Francesco Marchini (*Divisione di Nefrologia II, Azienda Ospedaliera di Padova*); Francesco Leoncini (**); Luigi Chieco Bianchi (*); Maria Luisa Calabrò (*Immunologia e Diagnostica Molecolare Oncologica, Azienda Ospedaliera di Padova*)

Background: Dopo oltre 10 anni dalla scoperta di HHV8, il sistema più efficiente per la propagazione di HHV8 in coltura è rappresentato quasi esclusivamente dalla stabilizzazione di linee cellulari derivate da rari casi di linfoma primitivo delle cavità sierose (“primary effusion lymphoma”, PEL). Nell’ambito dello studio delle interazioni virus-cellula ospite coinvolte nei meccanismi di trasmissione e nella patogenesi di HHV8, abbiamo valutato la suscettibilità all’infezione di HHV8 di diverse linee cellulari al fine di identificare una linea cellulare che consentisse l’isolamento di HHV8 e lo studio delle proprietà biologiche del virus in un contesto distinto da quello delle linee PEL.

Metodi: Abbiamo condotto saggi d’infezione nei quali le linee cellulari potenzialmente bersaglio d’infezione sono state esposte a sovrinatanti di colture cellulari stabilizzate da PEL; è stata quindi monitorata la persistenza di DNA virale mediante PCR e nested-PCR a tempi diversi dall’esposizione all’inoculo virale. Il pattern di espressione di HHV8 è stato valutato mediante RT-PCR e immunofluorescenza indiretta utilizzando primers e anticorpi specifici per trascritti e proteine della fase litica e latente di HHV8. La trasmissibilità del virus prodotto è stata saggiata tramite passaggi seriali di sovrinatanti da cellule HHV8-infettate a cellule non infettate. Sono stati poi messi a punto protocolli d’isolamento a partire da campioni (linfociti da sangue periferico e saliva) ottenuti da pazienti HHV8-sieropositivi asintomatici e da pazienti con AIDS-KS; la presenza e il carico virale nei sovrinatanti di coltura sono stati determinati mediante PCR e real-time PCR.

Risultati: Abbiamo identificato una linea linfocitaria B (derivata da cellule BJAB), denominata BBF, che si è dimostrata permissiva all’infezione di HHV8, in grado di sostenere sia la fase litica che la fase latente del virus, e di produrre una progenie virale trasmissibile. Sono stati utilizzati i sovrinatanti ottenuti da linfociti da sangue periferico, stimolati con n-butirrato, di 24 pazienti HHV8-sieropositivi sottoposti a trapianto di rene per infettare le cellule BBF, ed il virus è stato identificato nel sovrinatante di coltura di 11 pazienti. L’infezione delle cellule BBF con campioni di saliva è risultata altamente produttiva, confermando la presenza di particelle virali ad alto potenziale infettivo nella saliva di soggetti con AIDS-KS.

Conclusioni: Le nostre analisi hanno individuato un modello d’infezione in grado di rivelare HHV8 da campioni a bassa carica virale e di propagare il virus in coltura. Le cellule BBF costituiscono un sistema *in vitro* per la caratterizzazione delle proprietà biologiche degli isolati di HHV8 e la valutazione del loro eventuale valore predittivo/prognostico dello sviluppo e dell’andamento di tumori HHV8-correlati.

Contributo: 50F.7

SIGNIFICATO PROGNOSTICO DEI LIVELLI DI JCV DNA NEL LIQUOR DI PAZIENTI CON LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCALE PROGRESSIVA

Simona Bossolasco* (*Ospedale San Raffaele, Milano*); Giliola Calori (*); Francesca Moretti (*Università degli Studi di Brescia*); Antonio Boschini (*S. Patrignano*); Davide Bertelli (*Spedali Civili di Brescia*); Maurizio Mena (*Ospedale Cuggiono*); Simonetta Gerevini (*); Arabella Bestetti (*); Stefania Sala (*); Serena Sala (*); Adriano Lazzarin (*)

Background: La leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) rimane una complicanza frequente e mortale dell'infezione da HIV anche in pazienti trattati con HAART. Solo la metà dei pazienti con PML sopravvive alla malattia, ma non esiste alcun marcatore prognostico al momento della diagnosi.

Metodi: I livelli di JC virus (JCV) DNA sono stati misurati nel liquor di 61 pazienti con infezione da HIV e PML mediante una metodica di polymerase chain reaction (PCR) real-time. Questi pazienti comprendevano 38 trattati con HAART e 23 non trattati. La validità diagnostica della metodica è stata valutata mediante confronto tra i risultati ottenuti nel liquor e le diagnosi istologiche ottenute all'esame post-mortem in pazienti con PML o altre patologie neurologiche. Il significato prognostico è stato valutato confrontando i livelli di JCV DNA nel liquor con la sopravvivenza ed altre variabili.

Risultati: La metodica utilizzata è risultata avere una sensibilità e specificità diagnostica rispettivamente del 76% e 100%. Nel primo campione di liquor prelevato dalla comparsa dei primi sintomi di PML, i valori di JCV DNA variavano da <2.00 a 7.71 log copie/mL (mediana 3.64). In pazienti non trattati, livelli di JCV DNA >3.64 copies/mL erano correlati in modo significativo ad una ridotta sopravvivenza ed ad un basso numero di linfociti CD4 positivi. Tuttavia, entrambe le correlazioni venivano perse nei pazienti trattati con HAART. I livelli di JCV DNA nel liquor di 6 pazienti che avevano sviluppato PML durante le prime settimane dall'inizio di HAART in concomitanza ad una importante risposta viro-immunologica non erano significativamente differenti da quelli presenti nel liquor degli altri pazienti. L'analisi di campioni sequenziali di 24 pazienti dimostrava una riduzione importante dei livelli di JCV DNA nei pazienti trattati che mostravano una stabilizzazione della malattia, ma non nei pazienti non trattati o in quelli trattati che mostravano invece un'evoluzione fatale. Inoltre, i livelli di HIV-1 RNA diminuivano ed il numero dei linfociti CD4 aumentavano più marcatamente nei pazienti trattati che mostravano progressione della PML rispetto ai pazienti che andavano incontro a stabilizzazione clinica, indicando un possibile effetto dell'immunoricostruzione indotta da HAART sulla sopravvivenza della PML.

Conclusioni: La determinazione dei livelli di JCV DNA nel liquor rappresenta un marcatore virologico utile per il monitoraggio della PML in pazienti trattati con HAART.

Contributo: 50F.8

FATTORI PREDITTIVI DI OSTEOPENIA/OSTEOPOROSI IN PAZIENTI HIV-POSITIVI

Marco Bongiovanni* (*Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi di Milano, Ospedale L Sacco*); Alfonso Fausto** (*Unità Diagnostica per Immagini, Policlinico S. Donato, Milano*); Paola Cicconi (*); Laura Menicagli (**); Sara Melzi (*); Teresa Bini (*); Francesco Sardanelli (**); Antonella D'Arminio Monforte (*)

Background: La terapia HAART, nonostante l'elevata efficacia immuno-virologica, è spesso associata alla comparsa di effetti collaterali. Negli ultimi anni, è stato dimostrato un incremento del rischio di sviluppare alterazioni del metabolismo osseo (osteopenia e/o osteoporosi) nei pazienti HIV-positivi. Il ruolo della HAART nella comparsa di tale complicanza è ancora da stabilire.

Metodi: Abbiamo incluso nello studio 161 pazienti HIV positivi, sia naive che in terapia, consecutivi di età compresa tra 30 e 50 anni. Pazienti con malattie endocrine, in menopausa o amenorrea, in terapia con steroidi e/o estrogeni, alcolisti o tossicodipendenti, con diarrea cronica o sindrome da malassorbimento, con Body Mass Index (BMI) < or >20% rispetto al normale sono stati esclusi dallo studio. La densità ossea (BMD) è stata valutata tramite DEXA a livello lombare (L1-L4) e femorale, utilizzando i criteri dell'OMS per la diagnosi di normalità, osteopenia e osteoporosi. Tutti gli esami sono stati eseguiti nello stesso centro dallo stesso radiologo, che non era a conoscenza dello stato terapeutico (naive o in HAART) dei pazienti. Abbiamo utilizzato il test t per confrontare le caratteristiche demografiche nel gruppo di pazienti naive e in terapia e l'analisi di regressione logistica per identificare i fattori predittivi di osteopenia/osteoporosi; le variabili considerate sono state: sesso, età, fattori di rischio per HIV, stadio CDC, anni di HIV-positività e di HAART, CD4 e HIV-RNA al baseline e BMI.

Risultati: Le caratteristiche demografiche dei due gruppi, 48 naive e 113 in HAART, erano simili. 80 (49.7%) pazienti presentavano un quadro di osteopenia/osteoporosi alla DEXA: 22 (45.8%) erano naive (17 osteopenici e 5 osteoporotici) e 58 (51.3%) in HAART (48 e 10, rispettivamente) (p=0.46). Fattori predittivi di osteopenia/osteoporosi sono risultati: età avanzata (OR: 1.10, 95% CI: 1.01-1.20, p=0.03 per ogni anno in più), sesso femminile (OR:3.02, 95% CI: 1.26-7.25, p=0.01 vs maschi), bassi valori di BMI (OR: 0.78, 95% CI: 0.68-0.91, p=0.001 per ogni unità in più) ed elevati livelli di HIV-RNA al momento della DEXA (OR:1.97, 95% CI:1.16-3.34, p=0.01 per ogni Log10 in più). Nessuna associazione è stata osservata con l'utilizzo della HAART ((OR:2.61, 95% CI:0.66-10.27, p=0.17 vs naive) e con i markers biochimici di turnover osseo.

Conclusioni: Circa la metà dei pazienti HIV-positivi inclusi nel nostro studio presentava osteopenia/osteoporosi. I fattori di rischio tradizionalmente associati allo sviluppo tale patologia si sono confermati predittivi anche nella popolazione HIV-positiva; l'associazione osservata tra i livelli più elevati di HIV-RNA e osteopenia/osteoporosi può far ipotizzare un possibile ruolo del virus HIV stesso nella patogenesi di tale alterazione.

Contributo: 50F.9

EFFETTI DELLA TERAPIA ANTIRETROVIRALE CON GLI INIBITORI DELLA PROTEINASI SULL'ESPRESSIONE DI PROTEINASI DA PARTE DI *CANDIDA ALBICANS*

Flavia De Bernardis* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Evelina Tacconelli** (*Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Francesca Mondello (*); Silvia Arancia (*); Antonietta Girolamo (*); Giuseppina Mandarino (*); Roberto Cauda (**); Antonio Cassone (*)

Background: Le candidosi orofaringee e vaginali rappresentano le micosi opportunistiche più frequenti nel soggetto con infezione da HIV. L'introduzione della terapia antiretrovirale contenente inibitori della proteinasi di HIV (PI) ha determinato una significativa riduzione delle candidosi orofaringee (OC). In questo contesto è stato evidenziato che PI esercitano una inibizione diretta sulla secrezione di aspartyl proteinasi di *C. albicans*, considerata un importante fattore di virulenza per la colonizzazione mucosale. Tuttavia non sono stati determinati gli effetti diretti della terapia antiretrovirale con PI sugli isolati di *C. albicans* come un'eventuale selezione di ceppi diversi con resistenza a PI e/o un effetto sulla suscettibilità agli antimicotici. Lo scopo di questa ricerca è stato di condurre osservazioni cliniche e microbiologiche per il monitoraggio delle candidosi orofaringee e vaginali recidivanti in soggetti con infezione da HIV sotto terapia antiretrovirale (HAART) utilizzando uno schema di indagine clinica controllata per comparare i pazienti sotto HAART con inibitori della proteasi (PI) con quelli trattati con inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (nevirapina, efavirenz) (NNRTI).

Metodi: Sono stati monitorati 70 pazienti per la presenza di *Candida* spp. nel cavo orale per un totale di 180 giorni di follow-up. In tutti gli stipiti di *C. albicans* sequenzialmente isolati dai due gruppi di pazienti con differente terapia (HAART-PI e HAART-NNRTI). Sono stati analizzati il biotipo molecolare, la secrezione di proteinasi *in vitro* e *in vivo* e la suscettibilità agli antimicotici

Risultati: *Candida* spp. sono state isolate da 95 (64%) e da 70 (52%) campioni provenienti da 30 di 35 e da 27 di 35 pazienti trattati rispettivamente con HAART-PI e HAART-NNRTI. In entrambi i gruppi *C. albicans* è risultata la specie più frequentemente isolata. La terapia HAART-PI ma non quella HAART-NNRTI inibisce l'espressione di proteinasi nella cavità orale senza esercitare un effetto sulla selezione di particolari biotipi di *C. albicans* con ridotta secrezione di Sap *in vitro*, meno virulenti e più resistenti agli antimicotici. Inoltre stipiti di *C. albicans* isolati sequenzialmente da pazienti trattati con HAART-PI ma non quelli da pazienti con terapia HAART-NNRTI hanno mostrato un aumento della secrezione di Sap *in vitro*.

Conclusioni: Questi risultati hanno evidenziato che PI esercitano *in vivo* un effetto inibitorio sulla secrezione di proteinasi da partedi ceppi di *C. albicans* senza selezionare biotipi particolari con ridotte capacità di secernere proteinasi, maggiormente resistenti agli antimicotici e meno virulenti. Ciò invita a mantenere alta la sorveglianza delle candidosi nei soggetti HIV+ sotto terapia antiretrovirale.

Dati preliminari pubblicati: De Bernardis F., Tacconelli E., Mondello F., Cataldo A., Arancia S., Cauda R., Cassone A. Anti-retroviral therapy with protease inhibitors decreases virulence enzyme expression *in vivo* by *Candida albicans* without selection of avirulent fungus strains or decreasing their anti-mycotic susceptibility. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2004,41:27-34.

Contributo: 50F/C

ANALISI DELLA CARICA VIRALE DEL VIRUS JC, DEI GENOTIPI E DEI RIARRANGIAMENTI DELLA REGIONE REGOLATORIA NEL LIQUIDO CEFALORACHIDIANO DI PAZIENTI CON PML AIDS-CORRELATA TRATTATI CON HAART: CORRELAZIONI E IMPATTO SULLA PROGNOSI DELLA MALATTIA

Angela Marzocchetti* (*Malattie Infettive, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Maurizio Sanguinetti* (*Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Simona Di Giambenedetto* (*Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Antonella Cingolani* (*Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Adriana Ammassari* (*Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Giovanni Fadda* (*Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Roberto Cauda* (*Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Andrea De Luca* (*Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*)

Background: La Leucoencefalopatia Multifocale Progressiva (PML) è una patologia associata all'infezione litica degli oligodendrociti da parte del poliomavirus JC (JCV). Con l'introduzione della HAART la mortalità PML-relata resta intorno al 50% e i sopravvissuti mostrano una stabilizzazione dei deficit neurologici con conseguente invalidità più o meno grave. Abbiamo condotto uno studio sull'analisi di sequenza nucleotidica degli amplificati da liquor di pazienti con PML per verificare se un particolare genotipo o riarrangiamento della regione regolatoria (RR) potesse influenzare il decorso clinico della PML.

Metodi: Sono stati arruolati 59 pazienti con PML confermata virologicamente, 76% maschi, 63% tossicodipendenti; il 44% aveva effettuato HAART. L'età mediana era di 38 anni (range 27-61), il Karnofsky 60 (20-90); la media dei CD4 era 107 cellule/microlitro (0-1191), i livelli mediani di HIV RNA nel plasma (n=39) 4.44 log₁₀ copie/ml e nel liquor HIV RNA (n=16) 3.12 log₁₀ (1.30-5.35). I livelli liquorali del DNA di JCV determinati con la PCR semi-quantitativa (SM, n=59) e con la Real Time Taq-Man (RT, n=45) erano rispettivamente 3.94 log₁₀ e 5.12 log₁₀. I genotipi virali e i riarrangiamenti della regione regolatoria sono stati analizzati tramite sequenziamento automatico diretto. Sono stati quantificati i livelli di citochine infiammatorie (MCP-1, RANTES e TNF-1 ALPHA) nel liquor con metodi immunoenzimatici su fase solida. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate con test non parametrici, le correlazioni con la regressione lineare, le associazioni con la sopravvivenza con i modelli di Cox.

Risultati: La concentrazione di JCV DNA misurata con la RT (per ogni log₁₀ di copie più elevato, Rischio di morte 1.31, 1.11-1.55; p=0.001) è risultata più accuratamente predittiva della sopravvivenza che quantificata con la SM (p=0.07) e inversamente correlata con la concentrazione liquorale di MCP-1 nei pazienti PML. I genotipi di JCV erano disponibili per 14 pazienti: n=5 avevano genotipo 1a, n=5 1b e n=3 il 4. L'analisi dei riarrangiamenti della regione regolatoria, responsabile del neurotropismo e neurovirulenza, disponibile per 19 pazienti mostrava che tutte le sequenze, eccetto una, erano riarrangiate, con una media di 6.1 riarrangiamenti totali per isolato. Fattori associati con una riduzione della concentrazione di JCV DNA (RT) erano: precedente HAART (differenza media -1.90 log₁₀ copie/ml, p=0.01), conta basale dei CD4 (per ogni raddoppio del valore, media -0.51 log₁₀ copie/ml; p=0.009), livelli di MCP-1 nel LCR (per ogni log₁₀ più elevato, -1.69 log₁₀; p=0.036); il genotipo 4 (4 versus altri genotipi, -1.78 log₁₀; p=0.043) e il numero dei riarrangiamenti nella RR (per ogni riarrangiamento addizionale, la media di JCV DNA= -3.04 log₁₀ copie/ml; p=0.01). In un modello multivariato aggiustato per il precedente uso di HAART, elevati livelli di CD4 e MCP-1 erano indipendentemente associati a livelli inferiori di JCV DNA nel LCR. Durante 60 mesi di follow-up si sono verificati 36 decessi (61%) PML-relati. Un più elevato numero di mutazioni nella Regione Regolatoria mostrava un trend verso una maggiore sopravvivenza (p=0.055).

Conclusioni: Saranno necessari ulteriori analisi per chiarire meglio il ruolo dei differenti genotipi e riarrangiamenti virali.

Contributo: 50F.10

STUDIO DEI PARAMETRI VIROLOGICI E IMMUNOLOGICI IN PAZIENTI CON LINFOMA HIV+ E HIV- IN RISPOSTA A TERAPIA AD ALTE DOSI E TRAPIANTO AUTOLOGO DI CELLULE STAMINALI PERIFERICHE

Stefania Zanussi* (CRO, Aviano); Rosa Maria Tedeschi (*); MariaTeresa Bortolin (*); Chiara Pratesi (*); Monica D'Andrea (*); Cristina Caffau (*); Paola Varaschin (*); Alessia Marus (*); Carlo Costanzo (*); Cecilia Simonelli (*); Paolo De Paoli (*)

Background: La terapia ad alte dosi (HDC) con trapianto di cellule staminali periferiche autologhe (PBSCT) è ampiamente utilizzata come terapia di salvataggio nei linfomi della popolazione generale ed è considerata il trattamento di prima scelta nella recidiva chemio-sensibile. L'introduzione dell'HAART e il conseguente recupero del danno immunologico ha permesso di esplorare l'uso di terapie mieloablativa potenzialmente curative anche nei pazienti (pts) HIV+. Scopo dello studio è di valutare la cinetica di replicazione di HIV e alcune coinfezioni virali presenti (HCV, EBV) e il recupero immunologico nei pts con linfoma refrattario o in ricaduta sottoposti ad HDC e PBSCT.

Metodi: Da maggio 2001 fino a dicembre 2004 sono stati arruolati 61 pts di cui 32 HIV+ (24 NHL e 8 HD, età media 40 anni, 13 co-infetti con HCV e 3 con HBV) e 29 HIV- (13 NHL e 16 HD, età media 46 anni, 4 positivi per HCV e 1 per HBV). Marcatori: viremia HIV e HCV (b-DNA, Chiron), proviremia HIV (nested real time PCR), viremia EBV (TaqMan real time PCR), risposta anticorpale EBV (ELISA), CD4, CD8, CD4CD45RA, CD4CD45R0, CD19, CD56 (citofluorimetria), T cell receptor excision circles (TRECs) (TaqMan real time PCR). Follow-up: T0 (prima dell'inizio della CT debulking+G-CSF); T1 (al momento della raccolta delle cellule staminali); T2 (prima dell'inizio dell'HDC); T3 (dopo 15 giorni da PBSCT, periodo di aplasia), T4 (dopo 1 mese), dopo 3 mesi e, in seguito, ogni 3 mesi dopo PBSCT.

Risultati: Tra i 32 pts HIV+ arruolati nel protocollo terapeutico, 10 (6 NHL e 4 HD) sono a 12 mesi dal trapianto, 10 sono in fase di trapianto o lo hanno appena eseguito, 12 sono deceduti. Nel gruppo dei 29 pts HIV-, invece, 21 (7 NHL alto grado e 14 HD) hanno superato il trapianto, 5 stanno proseguendo il percorso terapeutico, 3 sono deceduti. Vengono presentati i dati relativi ai 10 pts HIV+ e ai 7 HIV- con NHL alto grado. Tutti i pts HIV+ sono in trattamento con HAART e la viremia è stabile (<50cp/ml) in 7/10 pts; 4 pts hanno interrotto temporaneamente l'HAART con un rialzo della viremia e della proviremia immediatamente controllato dal ripristino dell'HAART. Tutti i pts sono EBV sieropositivi con DNA virale rilevabile in 2 HIV+ e 2 HIV- da T0 a T3. Due pazienti sono HIV-HCV+ e 1 HIV+HCV+ con valori di HCV RNA stabili durante il follow-up (media 1194800, 52786 e 146657 UI/ml rispettivamente). A T0 tutti i pts presentano bassi valori di CD4 (206±113 vs 386±200, p=0.06 HIV+ vs HIV-). Il rapporto CD4/CD8 è significativamente inferiore negli HIV+ rispetto agli HIV- (0.2 vs 1.2). Prima dell'HDC, il n° di CD4 è ancora ridotto e il rapporto CD4/CD8 è inferiore a 1 in entrambe i gruppi. Dopo il periodo di aplasia, non ci sono differenze nella dinamica di recupero di CD4, CD45RA, CD8 e CD56 nei 2 gruppi. I CD4 ritornano a livelli basali entro 1 anno in entrambi i gruppi, mentre il rapporto CD4/CD8 resta <1 sia negli HIV+ che negli HIV- ancora dopo 1 anno. A quest'epoca l'analisi dell'output timico mostra un rilascio di TRECs/10e6PBMCs superiore negli HIV+ rispetto agli HIV- (HIV-: mediana 194, range 65-4431; HIV+: mediana 756, range 20-5787).

Conclusioni: La replicazione di HIV resta sotto controllo dell'HAART anche durante il periodo di aplasia. Non c'è replicazione significativa di EBV e anche la replicazione HCV non subisce variazioni correlabili alla grave linfopenia. Gli HIV+, pur partendo da livelli più bassi di linfociti, non mostrano differenze nella dinamica di immunoricostituzione rispetto ai pts HIV-.

Contributo: 50F.11

HHV-8 INDUCE LA RIATTIVAZIONE ED AUMENTA LA REPLICAZIONE DI HIV, SIA *IN VITRO* CHE *EX VIVO*

Elisabetta Caselli* (*Università degli Studi di Ferrara*); Monica Galvan (*); Enzo Cassai (*); Dario Di Luca (*)

Background: Diversi studi dimostrano che HIV stimola la riattivazione e la replicazione di HHV-8 e che, principalmente per l'azione di Tat, promuove lo sviluppo del sarcoma di Kaposi, associato ad HHV-8. D'altra parte, l'effetto di HHV-8 su HIV è ancora per lo più sconosciuto. Nostri studi precedenti hanno dimostrato che ORF50, un gene transattivatore di HHV-8 espresso nelle primissime fasi dell'infezione, interagisce sinergicamente con Tat di HIV, inducendo la transattivazione di LTR ed aumentando la suscettibilità cellulare all'infezione con HIV. Abbiamo voluto verificare se queste interazioni molecolari avessero effettivamente un significato biologico, ed abbiamo studiato gli effetti causati su HIV dall'infezione con HHV-8 in diversi sistemi cellulari ed in linfociti e macrofagi isolati da pazienti HIV positivi.

Metodi: Abbiamo ottenuto inoculi purificati di HHV-8 cell-free, mediante stimolazione di linee cellulari cronicamente infettate e centrifugazione in gradiente di densità. Abbiamo verificato che tale inoculo virale mantiene l'attività infettante, eseguendo studi di suscettibilità all'infezione in vari sistemi cellulari. Abbiamo condotto gli esperimenti di coinfezione con HHV-8 e HIV in cellule endoteliali derivate da cordone ombelicale, in linfociti e macrofagi isolati da donatori sani, su linee cellulari monocitiche, nonché su PBMC e macrofagi isolati da pazienti HIV positivi asintomatici. Sono stati utilizzati sia ceppi di HIV linfocitotropici che monocitotropici, e la produzione di HIV è stata valutata quantitativamente.

Risultati: I risultati dimostrano che l'infezione di HHV-8 aumenta significativamente la replicazione di HIV sia in colture di monociti che di cellule endoteliali. Inoltre, l'infezione di HHV-8 induce la riattivazione di HIV in PBMC di pazienti asintomatici positivi ad HIV. Infine, è da notare che per avere la riattivazione di HIV non è necessario che i due virus coinfectino la stessa cellula, ma è sufficiente che siano infettate separatamente due cellule contigue.

Conclusioni: L'osservazione che la coinfezione con HHV-8 aumenta la replicazione di HIV suggerisce la possibilità che HHV-8 possa svolgere un ruolo nella fase iniziale della progressione dell'AIDS. I risultati suggeriscono che simili interazioni possano aver luogo anche *in vivo*, anche in considerazione del fatto che per la riattivazione di HIV non è necessaria una simultanea coinfezione della stessa cellula, ma potrebbe essere sufficiente la contiguità di cellule differentemente infettate in uno specifico sito anatomico.

Contributo: 50F.12

INIBIZIONE DELLA CRESCITA NEOPLASTICA E MECCANISMO DELL'AZIONE ANTITUMORALE DEGLI INIBITORI DELLA PROTEASI DI HIV

Cecilia Sgadari* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Elena Toschi (*); Davide Carlei (*); Laura Malavasi (*); Ilaria Bacigalupo (*); Clelia Palladino (*); Daniela Compagnoni (*); Chiara Chiozzini; Roberto Bugarini (*); Mario Falchi (*); Giovanni Barillari (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Paolo Monini (*); Barbara Ensoli (*)

Background: Le terapie anti-retrovirali contenenti gli inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI) hanno ridotto l'incidenza delle neoplasie associate ad AIDS e, nei pazienti trattati, inducono la regressione dei tumori. Questi effetti, tuttavia, non sono sempre correlati alla riduzione della viremia di HIV o al recupero dei linfociti CD4. Studi recenti hanno indicato che gli HIV-PI bloccano l'angiogenesi e l'invasione cellulare, e inibiscono la crescita o inducono l'apoptosi di cellule neoplastiche (Sgadari, *Nat Med* 2002; Monini, *Nat Rev Canc* 2004). Infatti, gli HIV-PI inibiscono le metalloproteasi della matrice (MMP) ed il proteosoma. Questi farmaci potrebbero quindi essere usati per la terapia dei tumori. Tuttavia, gli effetti sulle MMP e sul proteosoma vengono esercitati da diversi HIV-PI a diverse concentrazioni. In questo studio abbiamo valutato la capacità di HIV-PI ad alta o bassa biodisponibilità di inibire la crescita in topi nudi di tumori umani di diverso istotipo, ed il loro meccanismo d'azione *in vivo*.

Metodi: Topi nudi inoculati con cellule di carcinoma umano del polmone, della mammella, del colon o del fegato sono stati trattati con indinavir, un HIV-PI che blocca l'attivazione proteolitica di MMP-2 ed ha elevata biodisponibilità, o con saquinavir, che ha anche azioni inibitorie per il proteosoma ma inferiore biodisponibilità. I tumori sono stati analizzati per l'espressione di marcatori dell'endotelio (CD31, FVIII-RA), della proliferazione cellulare (Ki67), per l'espressione di p21 e, mediante TUNEL, per l'indice apoptotico. Gli effetti di indinavir e saquinavir sull'invasione, proliferazione, e sopravvivenza cellulare, e sull'accumulo di p21 e di proteine ubiquitinate, sono stati parallelamente determinati sulle cellule tumorali coltivate *in vitro*.

Risultati: Indinavir e saquinavir hanno significativamente inibito la crescita dei tumori nei topi inoculati, e ciò era associato ad una riduzione dell'angiogenesi. *In vitro*, entrambi i farmaci hanno bloccato l'invasione delle cellule neoplastiche, con effetti già evidenti alle concentrazioni di valle presenti nel plasma dei pazienti trattati, confermando che basse concentrazioni di questi farmaci sono in grado di bloccare l'attivazione proteolitica di MMP-2 (Sgadari, *Nat Med* 2002). A concentrazioni simili al picco plasmatico presente nei pazienti trattati, saquinavir, ma non indinavir, ha indotto apoptosi in cellule endoteliali, blocco della proliferazione delle cellule tumorali, e accumulo di p21 e proteine ubiquitinate, indicando effetti inibitori per il proteosoma. Queste azioni del saquinavir erano maggiormente evidenti per le cellule di carcinoma della mammella e del fegato; la crescita di questi tumori, tuttavia, è stata inibita con maggiore efficacia da indinavir. I livelli di apoptosi e di espressione di Ki67 e p21 nei tumori dei topi trattati con saquinavir o con indinavir non differivano da quelli dei topi trattati con soluzione salina.

Conclusioni: Gli HIV-PI inibiscono la crescita di tumori umani altamente prevalenti di diversa origine ed istotipo. Questa azione è essenzialmente mediata dalle proprietà antiangiogeniche ed anti-invasive di questi farmaci. Il blocco del proteosoma da parte di saquinavir non ha impatto per la crescita dei tumori *in vivo*, ma richiede concentrazioni elevate di farmaco che sono presenti solo transientemente nel plasma dei pazienti trattati. Questi dati aprono nuove prospettive per la terapia dei tumori basate sugli HIV-PI e loro analoghi dotati di accresciuto indice terapeutico.

Contributo: 50F/D

STUDIO CLINICO DI FASE II PER IL TRATTAMENTO DEL SARCOMA DI KAPOSÌ CLASSICO CON L'INIBITORE DELLA PROTEASI DI HIV INDINAVIR

Paolo Monini* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Cecilia Sgadari (*); M. Gabriella Grosso (*); Stefania Bellino (*); Elena Toschi (*); Ilaria Bacigalupo (*); Michela Sabbatucci; Giulia Cencioni; Sara Baccarini; Gaia Sciaranghella; Emanuela Salvi (*); Patrizia Leone (*); Gianni Rezza (*); Barbara Ensoli (*)

Background: Il trattamento dei soggetti infettati da HIV con gli inibitori della proteasi virale è associato ad una diminuita incidenza e alla regressione del sarcoma di Kaposi (KS). In questo contesto, abbiamo recentemente dimostrato che la somministrazione di inibitori della proteasi di HIV (PI) a topi nudi blocca lo sviluppo e induce la regressione di lesioni angioproliferative promosse da cellule KS o fattori angiogenici (bFGF, VEGF), e l'angiogenesi indotta da bFGF o VEGF nella membrana corioallantoidea di pollo (Sgadari *et al.*, *Nature Medicine* 2002). Questi effetti sono dovuti alla capacità dei PI di inibire l'invasione delle cellule endoteliali e delle cellule KS, e di bloccare l'attivazione proteolitica della metalloproteasi (MMP)-2, un enzima che svolge un ruolo chiave nell'angiogenesi e nell'invasione di tutti i tumori solidi. Questi dati indicano che i PI potrebbero essere impiegati nella terapia del KS e di altri tumori in soggetti non infettati da HIV. Abbiamo perciò avviato un trial clinico multicentrico per il trattamento del sarcoma di Kaposi classico (CKS) con indinavir in soggetti non infettati da HIV, di cui ISS è lo sponsor.

Metodi: La sperimentazione clinica consiste in uno studio di fase II, aperto, non randomizzato, e coinvolge 9 centri clinici italiani. Lo studio prevede l'arruolamento di 30 pazienti HIV-negativi stratificati per stadio di malattia (CKS lieve, stadi I/II, ed avanzato, stadi III/IV). L'indinavir viene somministrato per 12 mesi a dosaggio ridotto rispetto a quello utilizzato nei pazienti HIV+; al termine della terapia è previsto un follow-up di 12 mesi. Obiettivo primario della sperimentazione è la valutazione della risposta clinica alla terapia, la durata della risposta ed il tempo di progressione. Obiettivi secondari sono la valutazione della tollerabilità e delle proprietà farmacocinetiche dell'indinavir nei soggetti con CKS, e la determinazione di marcatori dell'angiogenesi e dell'invasione tumorale, quali i livelli plasmatici pre e post-terapia di MMP-2, MMP-9, bFGF, VEGF, ed il numero di cellule endoteliali circolanti. Poiché il KS è indotto dall'azione di citochine Th1 ed è associato all'infezione da HHV8, vengono inoltre determinati i livelli plasmatici pre- e post-terapia di IFN-gamma e IL-4, i titoli anticorpali e le risposte cellulo-mediate anti-HHV8.

Risultati: Sono stati fino ad ora valutati per l'ingresso nello studio 38 pazienti; di questi, 27 erano rispondenti ai criteri di inclusione del protocollo ed hanno iniziato il trattamento, con una mediana del tempo di trattamento di 23 settimane (range: 4-55). I 27 soggetti sono distribuiti uniformemente per stadio di malattia: 13 pazienti hanno un CKS lieve o iniziale (stadi I/II) e 14 medio-grave o avanzato (stadi III/IV). I pazienti in stadio III/IV presentano un'età più avanzata (mediana 75 aa, range 59-81) rispetto ai soggetti con KS lieve (età mediana 66 aa, range 51-83), ed una frequenza di complicanze di malattia più elevata (13/14 casi rispetto ai 6/13 con stadio I/II). Inoltre, 10/14 pazienti in stadio III/IV hanno già ricevuto trattamenti sistemici rispetto ai 6/13 in stadio I/II. Sono tuttora in trattamento 8 pazienti.

Conclusioni: È attualmente in corso una analisi ad interim che permetterà di valutare il conseguimento degli obiettivi primari e secondari. La valutazione clinica e le analisi di laboratorio indicano che la terapia con indinavir è ben tollerata in pazienti con CKS. La valutazione dell'azione antitumorale dell'indinavir sarà possibile alla conclusione dello studio.

Contributo: 50F/E

SVILUPPO DI UN VACCINO A DNA MULTIGENICO CONTRO LA TUBERCOLOSI

Giovanni Delogu* (*Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Cinzia Pusceddu (*); Rosaria Santangelo (*); Stefania Zanetti (*Università degli Studi di Sassari*); Giovanni Fadda (*)

Background: La tubercolosi (TB) rappresenta una delle principali patologie che colpiscono i soggetti con infezione da HIV. Il vaccino BCG presenta due inconvenienti: attività protettiva variabile nell'uomo e divieto di somministrazione per ragioni di sicurezza in soggetti con infezioni da HIV. Il presente progetto si propone di sviluppare un nuovo vaccino a DNA nei confronti di *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) capace di indurre un'attività protettiva superiore o equivalente a BCG. Studi precedenti hanno dimostrato che un vaccino costituito da un cocktail di plasmidi codificanti ciascuno per un singolo antigene di Mtb è in grado di indurre un livello di protezione equivalente a quello indotto da BCG nel modello murino. Tale livello di protezione veniva raggiunto sebbene la quantità somministrata di singolo plasmide non fosse ottimale. Al fine di migliorare l'efficacia di tali vaccini, abbiamo previsto uno schema di ricerca che si articola in due fasi. Durante la prima fase si procede alla costruzione dei costrutti in cui 2 o più geni di Mtb vengono clonati in frame, così da poter esprimere delle proteine di fusione. L'immunogenicità e l'attività protettiva indotta da tali vaccini verrà determinata nel modello di TB murina. I costrutti che si riveleranno più promettenti verranno utilizzati nella fase successiva, che ha come obiettivo lo sviluppo di un vaccino a DNA bi-cistronico costituito dalla componente multigenica di Mtb e da una sequenza immunostimolatrice.

Metodi: - I geni selezionati (esat-6, Ag85b, mpt64, mpt63, mpt83, katG, mtb39a, mtb12) sono stati clonati nel plasmide pCR2.1 e quindi trasferiti nel plasmide pJW4303, in frame con due sequenze di origine eucariotica: tissue plasminogen activator signal sequenze (tPA) e l'ubiquitina (Ub). Tali geni sono stati clonati in frame tra loro, al fine di produrre dei multigeni. A valle delle sequenze geniche di Mtb è stata clonata una sequenza genica codificante per l'epitopo HA. - La corretta espressione dei multiantigeni è stata saggiata transfettando cellule di rhabdomyosarcoma (RD) *in vitro* con i costrutti sviluppati e ricercando l'espressione dei multiantigeni con l'anticorpo specifico anti-HA. - I vaccini a DNA che rispondevano ai requisiti di corretta espressione e turnover intracellulari sono utilizzati per immunizzare topi C57Bl/6.

Risultati: I geni selezionati sono stati clonati in modo da costruire dei multigeni. I risultati ottenuti mediante i saggi di transfezione e successiva immunofluorescenza eseguita utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-HA, hanno permesso di dimostrare la corretta espressione dei multiantigeni. Inoltre, la fluorescenza osservata nelle cellule RD transfettate ha permesso di dimostrare il diverso turnover intracellulari degli antigeni espressi come proteine di fusione con la sequenza tPA rispetto a quelli ottenuti con la sequenza Ub. Per questa prima fase della sperimentazione abbiamo selezionato 6 costrutti che codificano per più multiantigeni per l'immunizzazione dei topi C57Bl/6. L'immunizzazione ha avuto inizio ed i risultati dell'attività protettiva sono attesi per la fine di giugno.

Conclusioni: I risultati ottenuti nei primi mesi della ricerca in oggetto hanno permesso di dimostrare come il rationale proposto sia valido. In particolare si è potuto dimostrare come i costrutti a DNA sviluppati esprimano correttamente i multiantigeni. È stato possibile dimostrare il diverso turnover intracellulari dei costrutti che esprimono proteine di fusione con l'ubiquitina rispetto alla sequenza tPA. Sarà interessante verificare se i due tipi di costrutti inducono lo stesso livello di attività protettiva nel modello di TB murina.

Contributo: 50F.13

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI NUOVE PROTEINE DEL VIRUS DI EPSTEIN-BARR, E LORO RUOLO NEL PROCESSO DI MATURAZIONE INTRACELLULARE DEL VIRUS

Antonella Farina* (*Dip. di Medicina Sperimentale e Patologia, Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Roberta Gonnella (*); Roberta Santarelli (*); Marisa Granato (*); Roberto Bei (*Dip. di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Salvatore Raffa** (*Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Roma*); Maria Rosaria Torrisi (**); Antonio Angeloni (*); Alberto Faggioni (*)

Background: Abbiamo identificato recentemente una proteina del ciclo litico di EBV, BFRF1, espressa precocemente nella fase replicativa del virus. BFRF1 è localizzata preferenzialmente sulla membrana nucleare delle cellule infettate, ed è abbondantemente espressa in lesioni di leucoplachia orale della lingua in soggetti HIV positivi. BFRF1 è l'omologo posizionale della proteina UL34 di HSV-1, che svolge un ruolo essenziale nell'acquisizione dell'envelope a livello della membrana nucleare, in cooperazione con il prodotto del gene UL31. Per analizzare il ruolo funzionale di BFRF1, abbiamo costruito un virus ricombinante privo del gene BFRF1, ed abbiamo identificato la proteina codificata dall'omologo in EBV di UL31, BFLF2, per verificare le sue eventuali interazioni con BFRF1.

Metodi: Per analizzare la funzione di BFRF1, abbiamo costruito un mutante di EBV (BFRF1-KO) delecto del gene BFRF1 mediante la tecnologia del cromosoma batterico artificiale (BAC). L'infettività del virus mutante rispetto al wild type è stata analizzata mediante saggi di binding, di immortalizzazione di linfociti B, di analisi dell'espressione di proteine precoci e tardive del virus, nonché mediante osservazione della maturazione intracellulare del virus al microscopio elettronico. Il gene BFLF2 è stato clonato mediante PCR, ed una proteina di fusione è stata utilizzata per la generazione di anticorpi monoclonali. La trascrizione ed espressione di BFLF2 sono state analizzate mediante northern e western blot, e la sua localizzazione intracellulare mediante microscopia confocale ed elettronica.

Risultati: In seguito all'induzione del ciclo litico virale, cellule 293 infettate con virus BFRF1-KO non hanno mostrato differenze rispetto a cellule infettate con virus wild type in termini di replicazione di DNA o di espressione di proteine viral tardive. Tuttavia, sia saggi di binding virale che di infezione di diverse linee cellulari o di immortalizzazione di linfociti B umani hanno evidenziato una drastica riduzione nel titolo del virus mutante, che è tornato ai livelli del virus wild type in seguito a ricomplementazione con un vettore di espressione per BFRF1. L'analisi al microscopio elettronico ha dimostrato che la riduzione di produzione virale era dovuta all'accumulo di nucleocapsidi in prossimità della membrana nucleare interna. Inoltre abbiamo identificato una nuova proteina codificata dal gene BFLF2, omologo posizionale di UL31 di HSV-1, che dipende dalla espressione di BFRF1 per la localizzazione sulla membrana nucleare.

Conclusioni: I risultati dimostrano che BFRF1 è essenziale per una corretta acquisizione dell'envelope del virus a livello della membrana nucleare. Inoltre BFRF1 interagisce con una seconda proteina virale, BFLF2, con la quale forma un complesso in grado di legarsi a componenti della lamina nucleare.

Contributo: 50F.14

CARATTERISTICHE CLINICHE E MOLECOLARI DELLE LEUCOENCEFALOPATIE CORRELATE AD HIV DURANTE LA TERAPIA HAART

Pasquale Ferrante* (*Lab. di Biol. Molec. e Biotec., Fondazione "Don C. Gnocchi" - IRCCS, Milano*); Serena Delbue (*); Marina Saresella (*); Enrico Marchioni (*Clinica Neurologica Mondino, IRCCS, Pavia*); Elena Colombo (*); Franca Guerini (*); Roberta Mancuso (*); Greta Spoladore** (*Dip. di Malattie Infettive, IRCCS S. Matteo, Pavia*); Giovanni Sotgiu (**); Renato Maserati (**)

Background: L'introduzione della HAART ha modificato lo scenario dei disordini neurologici correlati ad HIV, riducendo il tasso di mortalità nei pazienti HIV+. La diminuzione dell'incidenza della PML e delle Leucoencefalopatie non determinate (NDLE) non è però stata rilevante.

Metodi: Lo scopo dello studio longitudinale in corso consiste nel comprendere l'eziopatogenesi delle leucoencefalopatie durante infezione da HIV, attraverso l'analisi dei parametri clinici, virologici ed immunologici dei soggetti arruolati. Al momento dell'arruolamento, soggetti HIV+ trattati con HAART sono sottoposti ad osservazione clinica, risonanza magnetica (MRI) e tipizzazione HLA molecolare. Studi virologici vengono eseguiti su campioni di liquido cefalo rachidiano (CSF) ogni 6 mesi, per verificare la presenza del virus JCV e di altri virus neurotropi (HSV1/2, VZV, EBV, HCMV, HHV6, HHV8); inoltre, viene misurata la carica virale di HIV e JCV nel CSF, mediante RealTime PCR e la concentrazione di MCP1, attraverso test EIA. L'analisi immunologica, eseguita ogni mese, consiste nella misura, attraverso citofluorimetria, della produzione di TNF α , IFN γ e IL2 da parte di PBMC, prima e dopo stimolazione con peptidi, HLA ristretti, della proteina VP1 di JCV.

Risultati: Nel periodo compreso tra maggio 2003 e febbraio 2005, sono state eseguite osservazioni cliniche e MRI di 135 soggetti HIV+ considerati eleggibili per lo studio: sono stati arruolati 19 soggetti con MRI+ e 40 con MRI- (30 dei quali senza sintomi neurologici e 10 affetti da patologie neurologiche, OND), assieme a 27 soggetti sani (HC), costituenti il gruppo di controllo. Al momento dell'arruolamento, non c'era presenza di alcun virus nel CSF di 11 pazienti, classificati come possibili NDLE, mentre il genoma di VZV e di EBV sono stati trovati nel CSF di 2 soggetti con OND e DNA di JCV (carica virale media: 12.29 ln copie/ml) è stato amplificato nel CSF di 6 pazienti affetti da PML. I livelli di MCP1 e RNA di HIV nel CSF sono correlati positivamente nei tre gruppi. È interessante notare come il DNA di JCV sia stato ritrovato nel tessuto cerebrale biotico di due pazienti, mentre nel CSF degli stessi, il genoma virale è stato identificato solo 7 mesi dopo. Inoltre, durante il follow-up, DNA di JCV è stato amplificato nel liquor di un soggetto OND. Per quanto riguarda i dati immunologici, la produzione di IFN γ da parte sia delle cellule CD4+ che CD8+, in seguito a stimolazione peptidica, è significativamente ($p < 0.05$) più elevata nei soggetti NDLE (0.60%) e PML (0.51%), rispetto a HC (0.01%).

Conclusioni: Nessun virus è stato ritrovato nei CSF di soggetti con NDLE, ma la risposta immunitaria diretta contro JCV, osservata sia nei pazienti con PML, che in quelli con NDLE e la positività per JCV di due biopsie cerebrali sembra dimostrare che il virus intervenga, con un ruolo ancora da stabilirsi, nella patogenesi delle nuove forme di leucoencefalopatia. Inoltre, vista l'aumentata attività citotossica, sembra che anche il meccanismo immuno-mediato sia rilevante nella patogenesi delle lesioni demielinizzanti osservate nei pazienti con NDLE.

Contributo: 50F.15

NUOVE STRATEGIE SPERIMENTALI PER L'ANALISI DELLE RISPOSTE CD4 E CD8-MEDIATE NELLA COINFEZIONE HIV/HCV

Elisabetta Cariani* (*Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma*); Gabriele Missale (*); Massimo Pilli (*); Alessandro Zerbini (*); Carlo Ferrari (*)

Background: L'analisi della risposta CD8 diretta contro proteine di HCV è stata finora condizionata dalla necessità di utilizzare epitopi a restrizione HLA nota e dalla estrema variabilità di HCV. Per superare questi limiti, abbiamo sviluppato una tecnologia basata sul trasferimento del complesso HLA-peptide, reso fluorescente dalla fusione con EGFP, dalle cellule presentanti l'antigene (APC) ai linfociti effettori, che possono essere così visualizzati al citofluorimetro e caratterizzati dal punto di vista fenotipico e funzionale. Grazie alla trasfezione delle linee cellulari HLA-EGFP+ con RNA codificante per le proteine di HCV, e successivamente con RNA virali ottenuti dagli stessi pazienti, sarà possibile valutare nella fase successiva del progetto la risposta CD8 contro le varie proteine di HCV in pazienti con coinfezione HIV/HCV.

Metodi: I cDNA degli HLA-A1, -A2, -A3, -B51 (maggiormente rappresentati nella popolazione caucasica) sono stati inseriti in vettori contenenti la sequenza codificante per EGFP; i plasmidi ricombinanti sono stati sottoposti ad analisi di restrizione e di sequenza. Le linee cellulari difettive per HLA, K562, e Hmy2.CIR, sono state trasfettate con il costrutto HLA-EGFP, selezionate in G418, quindi con microbeads coniugate con Ab anti-HLA e clonazione. Il trasferimento di HLA-EGFP dalle APC agli effettori CD8 è stato studiato con peptidi di HCV contenenti epitopi CD8 a restrizione nota, confrontando l'efficienza di identificazione di linfociti CD8 HCV-specifici, rispetto a tecniche standardizzate, quali tetrameri HLA/peptide e colorazione intracellulare per g-IFN. Per valutare il riconoscimento di antigeni endogenamente prodotti, le linee HLA-EGFP+ sono state trasfettate con RNA trascritto *in vitro*, confrontando l'efficienza di trasferimento del complesso HLA-EGFP ai linfociti CD8, rispetto all'efficienza di colorazione con tetramero HLA/peptide.

Risultati: La comparsa di fluorescenza nelle cellule effettrici è stata osservata solo con le linee Hmy, ma non con le K562. Utilizzando peptidi di regioni non strutturali di HCV e di antigeni virali non correlati HLA-A2 ristretti, 22 campioni di PBL, linee e cloni CD8+ sono stati testati per la capacità di acquisire HLA-A2-EGFP+ dalle linee Hmy2. Una correlazione altamente significativa è stata riscontrata fra percentuali di CD8-EGFP+ e cellule tetramero+ ($p < 0.0001$), anche se la percentuale di queste ultime è sempre risultata più elevata. La media delle frequenze di cellule tetramero+ era 20.07%, mentre la media di positività EGFP era 12,5%. La percentuale di cellule EGFP+ risultava anche correlata alla percentuale di cellule capaci di produrre g-IFN ($p < 0.0001$). La cinetica del fenomeno mostrava cellule effettrici fluorescenti a partire da 30' di co-incubazione, raggiungendo il livello più alto dopo 60-90', con un lento declino a 180-240'. Il riconoscimento dell'antigene endogenamente prodotto è stato dimostrato in esperimenti preliminari, trasfettando le APC-EGFP+ con RNA precore-core di HBV e utilizzando un clone CD8 HBV-specifico (90% tetramero+). La percentuale di CD8 che assumevano l'HLA-EGFP+ è risultato variare dal 41 al 21%.

Conclusioni: I risultati ottenuti, anche se preliminari, prospettano la possibilità di un nuovo approccio sperimentale per l'analisi ex-vivo della risposta CD8 contro proteine intere di HCV e non contro semplici peptidi, utilizzabile per studiare il ruolo dei linfociti CD8 nella patogenesi della coinfezione HCV/HIV.

Contributo: 50F.16

SENESCENZA MOLECOLARE DEL SISTEMA IMMUNITARIO NEL CORSO DI INFEZIONE DA HIV

Ornella Francese* (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Riccardo Adamo (*); Barbara Ensoli (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Michela Pollicita (*); Stefano Aquaro (*); Carlo Federico Perno (*); Agnes R. Lopes** (*UCL London*); Mala K. Maini (**); Enzo Bonmassar (*)

Background: I meccanismi alla base del declino di cellule T CD4+ e la senescenza di T CD8+ osservati nel corso di infezione da HIV non sono del tutto noti. Diversi studi hanno mostrato una riduzione dell'attività telomerasica (in grado di compensare la progressiva erosione telomerica che si verifica in corrispondenza di ogni divisione cellulare) in PBL di pazienti infetti con HIV. Inoltre, nostri studi hanno mostrato precedentemente che Tat, il fattore trascrizionale di HIV, è in grado di diminuire l'attività telomerasica e l'espressione di hTERT, la subunità catalitica della telomerasi, nel compartimento nucleare di cellule T CD4+ non infette. L'età è un fattore di progressione importante per l'infezione da HIV. Le disfunzioni immuni causate da HIV e l'immunosenescenza sono associate a perturbazioni immunologiche comuni, incluso uno shift sistemico nel rapporto di cellule circolanti naive verso memory ed una aumentata suscettibilità dei linfociti ad apoptosi spontanea, oltre che ad una elevata percentuale di cellule memory con telomeri più corti.

Metodi: Abbiamo analizzato i livelli nucleari e citoplasmatici di telomerasi (TRAP Assay ed ELISA), la distribuzione intracellulare e il grado di fosforilazione di hTERT e di proteine coinvolte nella attivazione e traslocazione nucleare di hTERT in linfociti T CD4+ e CD8+ (Western Blot e immunoprecipitazione). Per valutare l'attività telomerasica in rapporto all'età e al grado di infezione dei pazienti, campioni di PBMC sono stati raccolti mensilmente per i primi sei mesi, da una coorte di 14 pazienti HIV+(età<30 e >50) prima e dopo l'inizio di terapia antiretrovirale (Zidovudine, Lamivudine, Abacavir ed Efavirenz). Oltre ad una caratterizzazione clinica dei pazienti abbiamo iniziato ad effettuare una analisi fenotipica e clonotipica del TCR. Carica virale e conta dei linfociti T CD4+ sono state valutate in corrispondenza di ogni tempo analizzato.

Risultati: Abbiamo osservato ridotti livelli di attività telomerasica e di espressione di hTERT nel compartimento nucleare di cellule T CD4+ infette. Tale riduzione era associata ad una alterazione del pathway di distribuzione intracellulare e di fosforilazione di Akt-PKB, una chinasi con attività antiapoptotica coinvolta direttamente nella fosforilazione, attivazione e traslocazione nucleare di hTERT. Inoltre, cellule T CD4+ esposte ad alte concentrazioni di Tat mostravano ridotti livelli di Akt fosforilata a carico del nucleo. Al contrario, cellule CD8+ esposte ad HIV mostravano una diminuzione della espressione nucleare di hTERT senza alterazione del pathway di Akt.

Conclusioni: Un effetto antiapoptotico di hTERT è stato dimostrato in diversi modelli. Quindi l'inibizione del trasporto intranucleare di hTERT e l'alterazione del pathway di Akt mediati da HIV in cellule CD4+, potrebbero almeno in parte contribuire all'apoptosi indotta in queste cellule dal virus. Inoltre la disregolazione di hTERT anche in linfociti CD8+ esposti ad HIV potrebbe accelerarne il progressivo deficit funzionale e proliferativo in corso di infezione. Stiamo attualmente esaminando l'attività telomerasica e la regolazione dell'espressione di hTERT in PBMC di pazienti, in rapporto all'età e alla carica virale, per investigare un possibile ruolo della disregolazione della attività telomerasica nella immunosenescenza indotta da HIV in diverse sottopopolazioni linfocitarie.

Contributo: 50F.17

IMMUNOGENICITÀ DELLA PROTEINA PPE44 (RV2770C) IN TOPI INFETTATI CON *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG E VALUTAZIONE PRELIMINARE DI UN VACCINO A DNA ESPRIMENTE PPE44

Daniela Bonanni* (*Dip. di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università degli Studi di Pisa*); Laura Rindi (*); Nicoletta Lari (*); Carlo Garzelli (*)

Background: Il genoma di *Mycobacterium tuberculosis* codifica per 69 proteine PPE (Pro-Pro-Glu) per le quali è stato ipotizzato un importante significato immunologico nell'infezione tubercolare, in quanto fonte di variabilità antigenica. Nel presente lavoro è stata studiata l'immunogenicità del prodotto del gene ppe44 (Rv2770c) in topi infettati con *Mycobacterium bovis* BCG e quindi è stato valutato il potenziale protettivo di un vaccino a DNA esprimente ppe44 in un modello murino.

Metodi: Il gene ppe44 è stato clonato dal DNA genomico di *M. tuberculosis* H37Rv in *E. coli* e la proteina ricombinante purificata (rPPE44) è stata utilizzata per valutare la risposta immune di topi infettati con *M. bovis* BCG. È stato quindi allestito un vaccino a DNA esprimente ppe44 (ppe44-DNA) mediante il quale topi Balb/c e C57Bl/6 sono stati immunizzati 3 volte per via intramuscolare. Tre settimane dopo l'ultima immunizzazione, è stato effettuato un challenge endovenoso con *M. bovis* BCG e le CFU sono state determinate nei polmoni, nel fegato e nella milza.

Risultati: Topi Balb/c infettati con *M. bovis* BCG per via sottocutanea hanno sviluppato alti titoli di anticorpi IgG anti-rPPE44 prevalentemente di isotipo IgG1; linfociti dei linfonodi drenanti e della milza, stimolati *in vitro* con rPPE44, hanno prodotto bassi livelli di IFN-gamma; inoltre, è stata osservata una modesta risposta DTH in seguito a challenge intracutaneo specifico. Risultati analoghi sono stati ottenuti in topi inoculati con *M. bovis* BCG per via endovenosa. Topi Balb/c vaccinati con ppe44-DNA hanno sviluppato anticorpi IgG1 anti-rPPE44 a titoli superiori rispetto alle IgG2a, mentre i linfociti splenici, stimolati *in vitro* con rPPE44, non hanno prodotto significativi livelli di IFN-gamma. Tale regime di immunizzazione ha conferito una modesta protezione nei confronti del challenge endovenoso con *M. bovis* BCG, come dimostrato da una significativa riduzione delle CFU nel polmone dei topi vaccinati, rispetto ai controlli immunizzati con il vettore privo di inserto. Topi C57Bl/6 vaccinati con ppe44-DNA hanno prodotto anticorpi anti-rPPE44 IgG1 e IgG2c a titoli pressochè equivalenti; cellule spleniche stimolate *in vitro* con rPPE44 hanno prodotto IFN-gamma, ma non IL-4. Gli animali vaccinati con ppe44-DNA hanno mostrato, dopo challenge endovenoso con *M. bovis* BCG, una riduzione significativa delle CFU nel polmone e nella milza rispetto agli animali di controllo.

Conclusioni: PPE44 rappresenta un nuovo antigene micobatterico espresso nel corso dell'infezione sperimentale da *M. bovis* BCG nel topo, che sembra polarizzare la risposta immune specifica verso un fenotipo Th2. L'immunizzazione di topi Balb/c e C57Bl/6 con ppe44-DNA conferisce una parziale protezione contro un challenge endovenoso con *M. bovis* BCG. Sono in corso studi per valutare differenti sistemi di "antigen delivery" volti a potenziare la componente immunitaria Th1, potenzialmente importante per la protezione, per chiarire definitivamente se la proteina PPE44 possa essere considerata quale candidato vaccino anti-tubercolare.

Contributo: 50F.18

IDENTIFICAZIONE DI EPITOPi CTL IN ANTIGENI LITICI DI HHV-8

Eliana Ribechini* (*Università degli Studi di Ferrara*); Cinzia Fortini (*); Paolo Monini (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Riccardo Gavioli (*)

Background: HHV-8 è un γ 2-herpesvirus eziologicamente associato al sarcoma di Kaposi (KS), la forma tumorale più comune in soggetti infettati dal virus HIV-1, ed anche ai linfomi ad effusione primaria (PEL) ed alla malattia multicentrica di Castleman. HHV-8, così come il virus di Epstein-Barr ed altri herpesvirus, induce un'infezione cronica che nei soggetti sani è controllata dal sistema immunitario, ma che nei soggetti HIV-positivi può portare a comparsa di tumori o altre patologie virus-associate. I linfociti T citotossici (CTL) giocano un ruolo chiave nel controllo immune di cellule infettate da HHV-8; attualmente sono stati identificate risposte CTL-specifiche dirette verso un ristretto numero di epitopi virali in soggetti infettati da HHV-8 e per questo motivo l'identificazione di nuovi epitopi immunogenici potrebbe essere utile per lo sviluppo di immunoterapie mirate per il trattamento di patologie associate a HHV-8.

Metodi: Per identificare i potenziali epitopi in grado di legare le molecole di HLA dei donatori inseriti nello studio, le sequenze delle proteine Orf 26, Orf 70, OrfK3e OrfK5 e sono state analizzate tramite uno speciale programma informatico che, sulla base del "binding motif" e della complementarità dei residui aminoacidici, fornisce tutti i possibili nonameri e decameri all'interno della sequenza proteica data in grado di legarsi alle molecole di HLA di interesse. Gli epitopi sono stati sintetizzati in fase solida e testati per la loro capacità di indurre risposte citotossiche specifiche; i PBL ottenuti da soggetti sani HHV-8 positivi, HLA-A2, A24 e B7 positivi, sono stati stimolati con i peptidi selezionati e la riattivazione CTL è stata valutata attraverso test di citotossicità e saggio ELISpot.

Risultati: Sono stati identificati nuovi epitopi CTL di proteine litiche di HHV-8 e presentati dalle molecole di HLA-A2, HLA-A24 e HLA-B7. In particolare sono stati identificati 3 epitopi di Orf26 presentati dall'HLA-A2; 5 epitopi di Orf70 di cui 3 presentati dall'HLA-A2, uno dall'HLA-A24 e uno dall'HLA-B7; 3 epitopi di OrfK3 di cui due presentati dall'HLA-A2 e uno dall'HLA-B7; un epitopo di OrfK5 presentato dall'HLA-A2.

Conclusioni: In questo studio sono stati identificati nuovi epitopi CTL di antigeni litici di HHV-8. Tutti i soggetti studiati presentano risposte dirette contro uno degli antigeni analizzati. I CTL ottenuti attraverso le stimolazioni con questi peptidi sono in grado anche di riconoscere linee PEL HHV-8 positive, dimostrando che essi sono reali target dell'immunità CTL-mediata *in vivo* e suggerendo che possano avere un ruolo nel controllo delle cellule infettate da HHV-8. Gli epitopi studiati rappresentano uno strumento per l'analisi delle risposte dirette contro HHV-8 in soggetti con tumori associati al virus per comprendere il ruolo del controllo CTL nei tumori HHV-8 positivi. Inoltre potrebbero essere utilizzati per lo sviluppo di immunoterapie mirate al potenziamento delle risposte CTL dirette contro HHV-8.

Contributo: 50F.19

LA PROTEINA E7 DI HPV16 ESPRESSA IN PIANTA INDUCE UNA RISPOSTA IMMUNO MEDIATA ED UNA SPECIFICA PROTEZIONE VERSO IL TUMORE HPV-ASSOCIATO

Colomba Giorgi* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Rosella Franconi** (*ENEA*); Aldo Venuti*** (*IFO*); Paola Di Bonito (*); Luisa Accardi (*); Silvia Massa (**); Elena Illiano (**); Antonio Muller (**); Alessia Cirilli (**); Felicia Grasso (*); M. Gabriella Donà (*)

Background: Il papillomavirus umano (HPV) è considerato l'agente causale del tumore alla cervice. Le proteine virali precoci E6 ed E7 sono fattori critici per lo sviluppo del tumore. Essendo costitutivamente espresse nelle cellule tumorali sono considerate "tumor-associated antigens" e rappresentano appropriati targets per l'immunoterapia di lesioni cancerose HPV-associate. Vaccini terapeutici basati su queste proteine ricombinanti sono in via di sviluppo ed il loro potenziale terapeutico sembra dipendere dall'adiuvante usato. Negli ultimi anni tecnologie basate sulle piante sono state usate anche per la produzione di antigeni vaccinali in grado di evocare una risposta immune. In questa comunicazione riportiamo la espressione di E7 di HPV16 in pianta ed il suo uso come vaccino in un modello animale e mostriamo che l'estratto di foglie contenente E7 è in grado di indurre una risposta cellulo-mediata senza l'aggiunta di adiuvanti e di proteggere i topi dal tumore.

Metodi: La proteina E7 di HPV16 è stata espressa in foglie di tabacco (*Nicotiana benthamiana*), sia nel citoplasma cellulare che nell'apoplasto mediante un vettore di espressione basato sul virus X della patata (PVX). Le foglie con sintomi di infezione sono state raccolte e le proteine solubili in PBS sono state estratte. La proteina E7 presente negli estratti è stata analizzata e quantificata mediante ELISA e Western blotting. Gruppi di 10 topi C57BL/6 sono stati inoculati s.c. quattro volte a distanza di 15 giorni con 500 ul di estratti da foglie infettate rispettivamente con PVXE7, PVXwt. Come controllo un gruppo di topi è stato inoculato con 10ug di E7 ricombinante purificata da batteri più l'adiuvante QuilA. Due settimane dopo l'ultimo booster i topi sono stati inoculati con le cellule tumorali C3 esprimenti E7. La crescita del tumore era monitorata mediante palpazione due volte a settimana. Le cellule sono state inoculate anche in un gruppo di topi non vaccinati. L'induzione di una risposta cellulo-mediata nei topi è stata valutata mediante ELISPOT su splenociti di topi sacrificati una settimana dopo l'ultimo booster e DTH.

Risultati: La proteina E7 era espressa sia nel citoplasma che nel pathway secretorio ma nel secondo caso il livello di espressione risultava almeno 5 volte maggiore che nel primo caso. La vaccinazione con i diversi estratti contenenti E7 induceva una risposta specifica sia anticorpale IgG che cellulo-mediata. I topi vaccinati con soluzione salina ed estratto di foglie da piante infettate con PVX-wt sviluppavano il tumore circa 10 giorni dopo il challenge mentre quelli vaccinati con estratti contenente E7 mostravano un ritardo nello sviluppo. Alla fine dell'esperimento, 50 giorni dopo il challenge il 40% dei topi vaccinati con Nb-PVX-E7 e l'80% di quelli vaccinati con Nb-PVX-PGIPss-E7 non avevano sviluppato tumore. Una protezione totale era ottenuta nei topi vaccinati con la proteina ricombinante più QuilA. È da sottolineare che la quantità di proteina somministrata ai topi è molto diversa nei tre casi (0.5ug, 2ug, 10ug rispettivamente). Inoltre i tumori sviluppati nei topi vaccinati risultavano più piccoli, di circa il 30%, di quelli sviluppati nei topi di controllo. Risultati preliminari indicano inoltre che cellule dendritiche caricate con gli estratti foliari contenenti E7 inducono una risposta citotossica.

Conclusioni: I dati riportati sono incoraggianti per lo sviluppo di un vaccino basato sull'espressione della proteina E7 in pianta ed aprono la strada ad una possibile vaccinazione orale.

Contributo: 50F/F

LA TUBERCOLOSI RESISTENTE AI FARMACI NELLE PERSONE CON INFEZIONE DA HIV IN ITALIA

Enrico Girardi* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Paola Vanacore (*); Beate Khoeler (*); Sergio Carbonara (*Università degli Studi di Bari*); Giorgio Antonucci (*); Giuseppe Ippolito (*)

Background: I pazienti con tubercolosi HIV associata rappresentano un target di particolare interesse per valutare l'impatto della tubercolosi farmaco-resistente.

Metodi: In Italia è stato condotto uno studio prospettico, osservazionale al quale hanno partecipato 96 Cliniche di Malattie Infettive. Dei 271 pazienti arruolati nello studio nel periodo maggio 1999-settembre 2000, sono stati inclusi nell'analisi 140 pazienti che presentavano diagnosi di tubercolosi e risultato di un test di sensibilità farmacologica eseguito sull'isolato. La tubercolosi resistente è stata definita come la resistenza all'isoniazide o alla rifampicina, la tubercolosi multiresistente come la resistenza all'isoniazide ed alla rifampicina

Risultati: Tra gli episodi di tubercolosi analizzati, 117 (83,6%) sono stati classificati quali nuovi casi e 23 (16,4%) quali casi precedentemente trattati. La prevalenza di resistenza ad isoniazide o a rifampicina era rispettivamente del 12,8% e del 4,3% tra i nuovi casi, mentre era del 17,4% e del 26,1% tra i casi precedentemente trattati. I tassi di prevalenza di tubercolosi resistente e multiresistente erano del 14,5% e del 2,6% tra i nuovi episodi e rispettivamente del 30,4% e del 12,5% tra i casi precedentemente trattati. Da questa analisi non sono emersi, tra le caratteristiche dei pazienti, fattori di rischio associati in maniera statisticamente significativa con forme di tubercolosi resistenti o multiresistenti, sebbene una più alta percentuale di casi di tubercolosi multiresistente sia stata osservata in pazienti con precedente episodio di TB, in pazienti senza fissa dimora o residenti in comunità, e tra gli stranieri.

Conclusioni: In Italia, tra i pazienti con infezione da HIV sono presenti elevati tassi di prevalenza di tubercolosi resistente e multiresistente, particolarmente tra i pazienti ritrattati. La validità dei risultati dello studio finora condotto, peraltro è limitata dal fatto che i dati sono generati dai laboratori con metodi non standardizzati. Per superare questo limite è stata avviata l'organizzazione, in collaborazione con la rete SMIRA, di un sistema sentinella basato su reparti di malattie infettive i cui laboratori di riferimento di microbiologia già partecipano, oppure verranno inclusi, in un sistema nazionale di controllo di qualità della valutazione di resistenza ai farmaci del micobatterio tubercolare. Questo consentirà di avere dati di maggiore affidabilità, ed integrabili con gli altri dati di sorveglianza generati a livello nazionale ed internazionale.

Coordinatori Regionali dello Studio GISTA-SIMIT: S. Babudieri, (Sassari, "SS. Annunziata"), M. Bassetti, R. Rosso, (Genova, "S. Martino"), G. Carosi, A. Matteelli, (Brescia, "Spedali Civili"), S. Carbonara, M. Heichen, (Bari, "Policlinico"), A. Chirianni, (Napoli, "Cotugno"), F. De Lalla, V. Manfrin, (Vicenza, "S. Bortolo"), G. Di Perri, (Torino, "Amedeo di Savoia"), M. Ghinelli, S. Carradori, (Ferrara, "Arcispedale S. Anna"), V. Guadagnino, (Catanzaro, "Policlinico Mater Domini"), F. N. Lauria, P. Fabietti, (Vasto, "Presidio Ospedaliero di Vasto"), F. Mazzotta, A. Gabbuti, (Firenze, "S. M. Annunziata"), S. Pauluzzi, M. B. Pasticci, (Perugia, "Policlinico Monteluca"), R. Russo, B. M. Celesia, (Catania, "Ascoli-Tomaselli"), M. L. Soranzo, B. Salassa, (Torino, "Amedeo di Savoia"), M. Toti, F. Zacchini (Grosseto, "O. Misericordia"), G. Vigevani, E. Iemoli, (Milano "Sacco").

Contributo: 50F.20

HCMV COME AGENTE IMMUNOSOPPRESSIVO: EFFETTO DELL'INFEZIONE SULLA FUNZIONALITÀ DI CELLULE DENDRITICHE *IN VIVO* E *IN VITRO*

Stefania Varani* (*Università degli Studi di Bologna*); Giada Frascaroli (*); Paola Dal Monte (*); Sara Pignatelli (*); Alessandro Ripalti (*); Gualtiero Alvisi (*); Maria Paola Landini (*)

Background: L'infezione da HCMV è in grado di causare immunodepressione nell'organismo ospite. Oltre alla presenza nel genoma virale di omologhi per geni cellulari coinvolti nella risposta immunitaria, un'altra strategia che il virus utilizza per causare immunosoppressione è l'interferenza con cellule che giocano un ruolo fondamentale nell'avvio della risposta immunitaria, quali cellule presentanti l'antigene. Le cellule dendritiche (DC) sono cellule presentanti l'antigene essenziali nell'avvio della risposta immunitaria. Inizialmente, le DC (e i loro precursori monociti) sono richiamate nei siti di infiammazione dove captano e processano gli antigeni virali. Dopo l'uptake di antigeni, le DC vanno incontro ad un processo di maturazione e migrano verso i tessuti linfatici dove selezionano ed inducono a proliferare i linfociti. La capacità delle DC di migrare prima ai siti di infiammazione e poi ai linfonodi è controllata da chemochine e recettori chemochinici. Intendiamo quindi: 1) valutare la funzionalità di DC circolanti e DC derivate da monociti nel corso di una infezione da CMV *in vivo*, in soggetti trapiantati di cuore ed immunocompetenti; 2) valutare le capacità migratorie e l'espressione di recettori chemochinici in DC e monociti infettati *in vitro* con ceppi endoteliotropi di CMV.

Metodi: Purificazione di monociti e cellule dendritiche dal sangue periferico di donatori sani, di pazienti immunocompetenti e immunocompromessi con infezione in atto da HCMV; differenziamento di cellule dendritiche da monociti mediante l'utilizzo di citochine; infezione *in vitro* e studio del ciclo replicativo virale; analisi delle caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche delle DC; analisi della pinocitosi, della stimolazione di linfociti T e della chemiotassi di cellule presentanti l'antigene.

Risultati: 1) Abbiamo dimostrato che durante l'infezione naturale, nel soggetto immunodepresso (trapiantati di cuore) le DC circolanti e quelle derivate da monociti possono essere infettate da HCMV ed esprimere proteine virali. Una volta differenziate *in vitro* a partire dai monociti, le DC ottenute dai pazienti infetti sia immunocompetenti che immunodepressi, presentavano ridotti livelli di molecole di istocompatibilità e una ridotta capacità di stimolare la proliferazione dei linfociti.

2) Abbiamo dimostrato che mentre monociti e DC immature risultano suscettibili all'infezione, le DC mature risultano resistenti all'infezione. Sia in monociti che in DC, l'infezione comportava una drastica riduzione di tutti i recettori chemochinici testati. L'effetto risultava essere specifico e funzionalmente significativo. Infatti è stato dimostrato che, durante l'infezione da HCMV la migrazione orientata o chemiotassi in risposta a stimoli infiammatori risultava drasticamente inibita.

Conclusioni: È stato provato che durante l'infezione *in vivo* da HCMV le DC vanno incontro a modificazioni immunofenotipiche e funzionali che nel complesso le caratterizzano come una popolazione cellulare poco attiva contro l'agente infettivo. È stato inoltre dimostrato che durante l'infezione *in vitro* da HCMV le DC ed i monociti vanno incontro ad una drastica riduzione dei loro recettori chemochinici e diventano incapaci di migrare in risposta a stimoli infiammatori lasciando presagire che il reclutamento nelle aree infiammatorie sia ridotto a seguito dell'infezione da HCMV.

Contributo: 50F.21

VALUTAZIONE DELLA SIGNIFICATIVITÀ DELL'HPV LOAD E DELLA PREVALENZA DI INFEZIONE DA HPV AD ALTO RISCHIO NELLA INSORGENZA DI LESIONI CERVICALI IN DONNE TRATTATE CON HAART

Flavia Lillo* (*IRCCS San Raffaele, Milano*); Davide Ferrari (*); Gianluca Taccagni (*); Sara Lodini (*); Adriano Lazzarin (*); Caterina Uberti Foppa (*)

Background: L'elevata frequenza di infezione da HPV nelle donne HIV positive rende necessaria l'individuazione di parametri predittivi di lesione cervicale di alto grado, soprattutto a seguito della aumentata sopravvivenza delle pazienti trattate con HAART.

Metodi: Quattrocento donne sono incluse nella presente valutazione. Il periodo medio di osservazione è di circa 5 anni range (2-10). I dati relativi alla patologia da HIV (CD4, viremia, terapia antiretrovirale) vengono aggiornati in base al follow-up ginecologico. È stato messo a punto un sistema di PCR real time su strumento Light Cycler, selezionando un set di primers consensus (SPF10) nella regione L1 e permette l'amplificazione della maggior parte dei tipi virali di interesse clinico. Il medesimo set di primers viene utilizzato per la tipizzazione virale. È in corso di messa a punto un metodo di sequenziamento di amplificati tipo specifici delle varianti dei ceppi oncogeni maggiori.

Risultati: La frequenza media di lesioni di alto grado (HSIL, CIN 2-3) rilevata all'ingresso nello studio è dell' 8.9% mentre le lesioni di basso grado (LISIL, CIN1) sono il 24%. La prevalenza di infezione da HPV ad alto rischio oncogeno è del 59.3%. Sessantuno pazienti (15%) sono state sottoposte a cono chirurgico per la rimozione di lesioni di alto grado (N=51) o di grado medio/basso (N=10). Come altri autori hanno segnalato, i risultati del nostro studio confermano che HAART non determina una modificazione né della frequenza e persistenza delle infezioni da HPV ad alto rischio oncogeno (HR-HPV) né della frequenza e prevalenza di lesioni cervicali di alto grado. Un'osservazione che ci sembra interessante, ma che è in corso di verificata statistica, è che la frequenza di HSIL all'ingresso nello studio sembra essere più che raddoppiata a partire dal 1998 (quindi circa 2 anni dopo l'introduzione di HAART) con un picco tra il 2001 e il 2003. I parametri CD4 e viremia HIV sono significativamente migliori rispetto alle donne trattate per HSIL fino al 1998. Il significato clinico dell'HPV-DNA load è stato studiato nelle donne sottoposte a cono chirurgico ed in un gruppo di controllo con analoghe caratteristiche cliniche (età, N° dei CD4, HIV-RNA load, terapia antiretrovirale), anch'esse positive per HPV DNA ad alto rischio, ma che non hanno sviluppato lesione. Il viral load è risultato significativamente più elevato nel gruppo sottoposto a cono chirurgico per HSIL sia quando misurato con PCR real time che nella valutazione dell'indice HC2 ($p=0.00036$ e $p=0.00030$ rispettivamente). Concentrazioni di DNA virale progressivamente decrescenti sono state rilevate anche nell'analisi dei campioni sequenzialmente raccolti dalle donne con lesione, confermando la riduzione della carica virale ottenuta a seguito della rimozione della lesione. La frequenza di infezioni multiple da HPV è risultata essere del 54.7% senza differenza significativa né per numero né per tipo virale identificato tra casi e controlli.

Conclusioni: I nostri dati suggeriscono che la valutazione della carica virale può essere un utile parametro supplementare che permetta di selezionare tra le donne positive per HPV ad alto rischio oncogeno quelle che più probabilmente svilupperanno lesione a breve termine. La frequenza di infezioni multiple rende complessa l'identificazione di tipi virali prevalentemente implicati nella genesi di lesione. Tuttavia lo studio delle varianti dei tipi oncogeni maggiori potrebbe consentire di individuare i ceppi prevalenti orientando strategie vaccinali di supporto.

Contributo: 50F.22

ROLE OF HUMAN HERPES VIRUSES IN AIDS

Fabio Santoro* (*DIBIT, Milano*); Alison Smith (*); Mauro Malnati (*); Angélique Biancotto** (*NIH*); Leonid Margolis (**); Chiara Foglieni (*); Lidia De Filippis (*); Angelo Vescovi (*); Samuele Burastero (*); Clara Paolucci (*); Paolo Lusso (*)

Background: HHV-6 is a CD4-lymphotropic virus that may cause immunosuppression and foster the progression of HIV disease. We have previously documented a dramatic acceleration of AIDS progression in *Macaca nemestrina* coinfecting with a pathogenic SIV strain (smE660) and HHV-6 A (strain GS) (Lusso *et al.* in preparation). Moreover, using the *ex vivo* lymphoid tissue model, we have demonstrated that HHV-6 may drive the phenotypic switch of HIV-1 by suppressing CCR5-tropic HIV-1 strains via RANTES induction, whilst enhancing CXCR4-tropic strains (Grivel *et al.*, *Nat. Med.* 2001). Thus, we have now retrospectively investigated the biological properties of SIV reisolated from HHV-6-coinfecting monkeys. In separate studies, we have investigated the effects of HHV-6 on dendritic cells (DC) maturation and function, as well as on differentiated primary human neural stem cells.

Methods: Sequential SIV isolates were obtained from frozen samples of both singly infected and coinfecting animals and extensively characterized for usage of coreceptors, sensitivity to chemokine-mediated inhibition, replication/cytopathicity in lymphoid tissue *ex vivo*. Dendritic cells were obtained from normal human peripheral blood by gradient separation, plastic-adherence and *in vitro* differentiation using IL-4 and GM-CSF; primary human neural stem cells, originally derived from fetal human brain, were differentiated *in vitro* by growth factor withdrawal.

Results: Preliminary results indicate that SIV reisolated from HHV-6-coinfecting macaques is indeed altered in its biological properties, with 2 out of 3 testable isolates showing a peculiar resistance to RANTES-mediated suppression. Of note, the 2 monkeys from which such isolates were derived were the first to progress clinically and immunologically toward terminal AIDS. We have recently demonstrated that, through its interaction with the CD46 receptor, HHV-6 dramatically suppresses the ability of macrophages to produce the cytokine IL-12 (Smith *et al.*, *Blood* 2003). We have now documented a similar effect on DC, showing that the suppression of IL-12 is accompanied by a defective DC maturation upon IFN-gamma/LPS treatment, as well as by a reduced ability to stimulate allogeneic T-cell proliferation. These results illustrate a novel mechanism of HHV-6-induced immunosuppression, which may be relevant to the progression of the immunodeficiency in HIV-infected subjects. We found that HHV-6 A, but not HHV-6 B, can replicate to some extent in differentiated neural stem cell cultures, causing a loss of lineage-specific markers, thus reinforcing the concept that the former variant has a peculiar neurotropism.

Conclusions: Our data strongly suggest that the selective pressure induced by HHV-6 *in vivo*, presumably through RANTES induction, may drive the biological evolution of SIV toward a more aggressive, RANTES-insensitive phenotype. The effects of HHV-6 on DC and neural stem cells may be relevant to the immunosuppression and neuropathology in AIDS.

Grant: 50F.23

LE SUPERFAMIGLIE DELLE PROTEINE MICOBATTERICHE PE E PPE: LOCALIZZAZIONE CELLULARE E POSSIBILE UTILIZZO PER LO SVILUPPO DI UN SISTEMA DI ANTIGEN DISPLAY

Alessandro Cascioferro* (*Università degli Studi di Padova*); Stefania Zoncatò (*) (*Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Riccardo Manganello (*)

Background: Il principale obiettivo del primo anno del progetto era quello di sviluppare un sistema di delivery che utilizzasse le proteine PE e PPE per veicolare antigeni sulla superficie di *M. bovis* BCG in modo da potenziarne le capacità immunogene. Le proteine PE e PPE costituiscono due superfamiglie di proteine a funzione ignota specifiche dei batteri appartenenti al genere *Mycobacterium*. In *M. tuberculosis* sono codificate da 168 geni che occupano circa il 10% del genoma totale. Ciascuna di queste due superfamiglie è caratterizzata da un dominio N-terminale di circa 110 (PE) e 180 (PPE) aminoacidi. Numerose evidenze indicano che le proteine PE e PPE sono associate alla parete e che il loro dominio N-terminale è responsabile di tale localizzazione. Dato che la parete micobatterica è un eccezionale immunogeno abbiamo proposto di caratterizzare meglio la localizzazione di queste proteine e di usarle per sviluppare un sistema di delivery per veicolare antigeni sulla superficie di *M. bovis* BCG al fine di potenziarne l'efficacia.

Metodi: I metodi di clonaggio e di analisi delle proteine utilizzati sono quelli standard. Per la microscopia a fluorescenza è stato utilizzato un microscopio confocale.

Risultati: Abbiamo prima scelto il gene codificante una proteina PE ed uno codificante una proteina PPE. Ciascuno di questi geni è stato usato per costruire fusioni traduzionali sia con la sequenza codificante la GFP che con l'epitopo HA. I costrutti così ottenuti sono poi stati inseriti in un plasmide capace di replicarsi nei micobatteri a valle di un promotore micobatterico costitutivo ed introdotti nel microrganismo modello *M. smegmatis*. I ceppi ricombinanti così ottenuti sono stati analizzati al fine di localizzare le proteine ricombinanti mediante fluorescenza diretta (fusioni con la GFP), immunofluorescenza (fusioni con l'epitopo HA), frazionamento cellulare e saggi durante i quali i batteri venivano prima trattati esternamente con tripsina allo scopo di degradare le proteine esposte sulla superficie e poi lisati ed analizzati mediante Western blot. I dati ottenuti indicano che sia il dominio PE che il dominio PPE sono necessari e sufficienti per trasportare la GFP ed il dominio HA all'esterno della cellula in modo che essi siano esposti all'azione della tripsina. Il dato è stato confermato mediante frazionamento cellulare. Dall'osservazione al microscopio a fluorescenza dei batteri esprimenti le proteine di fusione con la GFP è stato possibile evidenziare che la maggior parte delle proteine di fusione si concentra alle estremità dei batteri ed in corrispondenza del setto. Tale distribuzione è stata confermata anche mediante immunofluorescenza effettuata su ceppi esprimenti proteine di fusione con l'epitopo HA. Al fine di saggiare la possibilità di utilizzare questi domini per esprimere antigeni sulla superficie dei micobatteri, abbiamo costruito fusioni traduzionali tra l'antigene tubercolare Mtp64 e varie porzioni della proteina PE che abbiamo utilizzato in questo lavoro. Tale antigene è stato anche fuso ad un'altra proteina PE non correlata con la precedente. Abbiamo scelto l'antigene Mtp64 in quanto è un antigene protettivo ed è assente in BCG. Stiamo al momento caratterizzando la localizzazione cellulare di tali proteine di fusione.

Conclusioni: Le proteine PE e PPE di *M. tuberculosis* sono proteine esportate e possono essere considerate ottimi candidati da utilizzare come partner di fusione per il trasporto di antigeni sulla superficie dei micobatteri.

Contributo: 50F.24

CARATTERIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ PROTEASICA DI *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* E VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEGLI INIBITORI DELLA PROTEASI DI HIV

Cristina Mussini (*Clinica delle Malattie Infettive, Università degli Studi di Modena*); Marcello Pinti* (*Dip. di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Modena*); Andrea Cossarizza (*); Carlotta Orsi (*Dip. di Microbiologia, Università degli Studi di Modena*)

Background: Indagini *in vitro* hanno consentito di dimostrare come il trattamento di *C. neoformans* con indinavir ne influenzi significativamente la fisiologia e la virulenza. Considerati questi dati e quanto riportato in letteratura, è perciò stato ipotizzato che in *C. neoformans* esistano uno o più geni di aspartil proteasi, la cui attività potrebbe essere suscettibile agli inibitori della proteasi di HIV. Indagini in tal senso hanno consentito l'identificazione, caratterizzazione e purificazione (in forma ricombinante con una coda di 6His in N-terminale) di una aspartil proteasi (CnAP1) di *C. neoformans*. Lo scopo di questo lavoro è l'ulteriore caratterizzazione di questo enzima e della sua trascrizione, e l'identificazione di altre attività aspartil proteasiche di *C. neoformans*, possibili target dei PI.

Metodi: La purificazione di CnAP1 viene effettuata con il kit Ni-NTA Spin kit (QIAGEN). L'attività proteasica di CnAP1 in presenza o meno di lopinavir (LPV) è stata misurata con il kit "EnzCheck protease assay kit". I saggi di real time PCR sono stati effettuati utilizzando gli strumenti iCycler (Biorad) o Gene Analyzer 7000 (ABI Prism). L'identificazione di una seconda aspartil proteasi di *C. neoformans* è avvenuta, come per CnAP1, mediante ricerca per omologia di sequenza nei database del progetto genoma di *C. neoformans*.

Risultati: L'attività di CnAP1 purificata è stata saggiata in presenza o meno di LPV a due diverse concentrazioni, 2,5 e 25 μ M e a due diversi pH (5.0 e 7.4). In ambedue i casi l'attività proteasica non ha mostrato differenze significative rispetto a quella osservata in assenza di farmaco. Poiché la presenza della coda di 6His potrebbe influire sull'interazione farmaco-enzima; stiamo riclonando il cDNA completo di CnAP1 in un vettore (pQE30Xa) che permette la successiva eliminazione della coda. Per valutare i livelli trascrizionali del gene CnAP1 in diverse condizioni culturali e in presenza o meno di PI, abbiamo messo a punto un saggio di real time PCR per CnAP1. Questa metodica è stata testata sul ceppo di H99, che mostra un livello trascrizionale del gene molto basso. Sono comunque in corso prove con diversi PI. È in corso inoltre uno screening su altri ceppi di *C. neoformans* nel tentativo di identificare dei migliori produttori di proteasi, con possibilmente più alti livelli di espressione del gene CnAP1. Infine, a partire dai dati del progetto genoma di *C. neoformans*, e sulla base della omologia di sequenza con SAP5 di *C. albicans*, abbiamo identificato un secondo EST codificante per una aspartil proteasi. Mediante tecnica RACE è stato amplificato il cDNA, lungo 1933 pb e codificante per una proteina di 490 AA. Il gene comprende 7 esoni e 6 introni. La proteina codificata, chiamata CnAP2, presenta un alto grado di similarità (35-47%) con aspartil proteasi di eucarioti; tutti gli AA essenziali per l'attività enzimatica sono conservati. Il cDNA completo di CnAP2 è stato clonato nel vettore pQE30Xa per permetterne la successiva espressione purificazione, e la valutazione della sensibilità ai PI.

Conclusioni: L'attività enzimatica di CnAP1 ricombinante non sembra essere influenzata dai PI, né da IND né da LPV; conclusioni definitive potranno essere tratte solo dopo l'analisi della proteina senza coda di 6His. Esiste una seconda aspartil proteasi di *C. neoformans*, che stiamo caratterizzando per valutare se costituisce il reale target dei PI.

Contributo: 50F.25

VARIAZIONI FENOTIPICHE IN APC INDOTTE DALL'INFEZIONE CON ALCUNI PATOGENI OPPORTUNISTI: IMPLICAZIONE PER L'INFEZIONE DA HIV

E. Coccia* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); V. Gafa (*); C. Gagliardi (*); E. Giacomini (*); M. E. Remoli (*); M. Severa (*); R. Teloni (*); R. Lande (*); R. Nisini (*)

Background: La possibile interferenza della coinfezione delle APC con HIV e patogeni opportunisti ai fini della replicazione di HIV è un aspetto di particolare interesse. È stato descritto che la coinfezione di macrofagi con vari patogeni generalmente correla con un'esacerbazione dell'infezione da HIV indotta dal rilascio di citochine infiammatorie. Tuttavia, recentemente è stato evidenziato che alcuni patogeni possono invece inibire o sopprimere la replicazione di HIV attraverso meccanismi non ancora identificati. Siccome le cellule dendritiche (CD) esprimono in membrana recettori coinvolti sia nell'infezione che nel veicolare HIV al linfocita T a livello della sinapsi immunologica, abbiamo studiato l'espressione di questi recettori in cellule infettate con alcuni patogeni opportunisti.

Metodi: CD, ottenute da monociti di donatori sani, sono state infettate con *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e BCG. Sono state messe a punto le condizioni di infezione per avere una massimale percentuale di cellule infettate in assenza di morte cellulare. La maturazione delle CD dopo infezione è stata analizzata valutando l'espressione di molecole MHC, di molecole di costimolo e dei corecettori importanti per l'infezione da HIV. L'espressione di citochine e chemochine è stata analizzata mediante ELISA e RT-PCR quantitativa.

Risultati: Abbiamo osservato che le CD, successivamente alle diverse infezioni, maturano inducendo l'espressione di molecole MHC e di costimolo. L'impatto di queste modificazioni fenotipiche è stato anche valutato in saggi di stimolazione linfocitaria. Un quadro più eterogeneo risulta dall'analisi della produzione di citochine pro-infiammatorie ed anti-infiammatorie. Infatti, mentre nessuno dei tre patogeni induce il rilascio di IL-1b, il TNF- α viene prodotto in diversa misura. L'*A. fumigatus* risulta essere il più forte induttore di TNF- α rispetto alla stimolazione delle CD con *C. albicans* o BCG. Per quanto riguarda la produzione della IL-10, una citochina inibitrice la replicazione di HIV, abbiamo invece osservato che il BCG risulta essere il più importante induttore rispetto all'*A. fumigatus* o alla *C. albicans*. L'analisi dei corecettori di HIV nelle CD dopo infezione con i diversi patogeni ha mostrato che *A. fumigatus* causa una diminuzione del recettore per il mannosio, che invece non viene modificato da BCG. Inoltre, mentre l'espressione del CCR5 è down-regolata durante l'infezione con *C. albicans*, quella di CXCR4 viene indotta suggerendo che le CD infettate da *C. albicans* possano essere più suscettibili all'infezione con ceppi T-tropici di HIV. L'analisi dell'espressione di questi recettori verrà estesa anche a colture di CD infettate con BCG ed *A. fumigatus*. Siccome la modulazione del recettore CCR5 è principalmente dovuta al rilascio da parte delle CD stesse di CCL3 e CCL4 sono in corso esperimenti per valutare la produzione di queste chemochine successivamente all'infezione con i tre patogeni opportunisti.

Conclusioni: I dati ottenuti indicano che l'infezione con i patogeni succitati alterano in modo differenziale l'espressione di recettori importanti per l'infezione da HIV e la produzione di citochine pro- ed anti-infiammatorie. In particolare, mentre i tre patogeni studiati sono parimenti capaci di indurre la maturazione delle CD, possiedono capacità distinte per quanto riguarda l'espressione dei corecettori dell'HIV e la produzione di citochine e chemochine. Sono attualmente in corso esperimenti per valutare se anche nei macrofagi questi patogeni inducono in modo differenziale l'espressione di queste molecole.

Contributo: 50F/G

CARATTERIZZAZIONE LONGITUDINALE DEI CORRELATI BATTERIOLOGICI NELLA STORIA NATURALE DI INFEZIONE CRONICA DA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Marco Rinaldo Oggioni* (*Università degli Studi di Siena*); Francesca Meacci (*) ; Caterina Costa (*) ; Manuela Pardini** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Francesca Zara*** (*Università degli Studi di Pavia*); Antonio Sarassi (*Broncopneumotisiologia II, A.O. Valtellina e Valchiavenna Presidio di Sondalo*); Panajota Troupioti (*Lab. di Micobatteriologia, A.O. Valtellina e Valchiavenna Presidio di Sondalo*); Germano Orrù (*Dip. di Scienze Odontostomatologiche, Università degli Studi di Cagliari*); Laura Pagani (***) ; Graziella Orefici (**); Lanfranco Fattorini (**)

Background: La farmaco-resistenza di *M. tuberculosis*, dovuta alla selezione di cloni portanti mutazioni, è generalmente la causa dei fallimenti terapeutici e del prolungato decorso clinico delle infezioni. Le singole mutazioni selezionate, conferenti farmaco-resistenza, sono gli unici cambiamenti molecolari individuabili che caratterizzano il susseguirsi e l'alternarsi di sottopopolazioni clonali di *M. tuberculosis* nell'ospite, durante le infezioni prolungate. Questo studio si prefigge di seguire la storia naturale della popolazione batterica infettante tramite lo studio sistematico dei polimorfismi nucleotidici (SNP) in isolati seriali di *M. tuberculosis*. Il presente studio multicentrico si basa su esperienze derivanti da un progetto europeo al quale tre delle unità di questo progetto partecipano.

Metodi: La raccolta campioni e l'analisi batteriologica di questo studio vengono effettuate presso il nosocomio di Sondalo, l'analisi molecolare avviene presso l'Università di Pavia e Siena (identificazione di specie e di polimorfismi nucleotidici), l'antibiogramma per farmaci di seconda scelta viene effettuato presso l'ISS e la tipizzazione molecolare tramite MIRU presso l'Università di Cagliari.

Risultati: Nei primi mesi di lavoro sono state messe a punto le procedure standard di operazione ed è stata iniziata la raccolta di campioni. Essendo lo scopo dello studio l'analisi di serie di campioni gran parte degli escreti e ceppi raccolti contengono ceppi MDR. Finora sono stati raccolti campioni seriali (escreti e ceppi) da una ventina di pazienti con 2 o più campioni per paziente. Le analisi molecolari mirate all'analisi dello sviluppo delle popolazioni batteriche sono in corso.

Conclusioni: Le conclusioni attuali permettono di confermare che la frequenza e il numero dei campioni seriali di *M. tuberculosis* isolati permetteranno un'adeguata analisi statistica dei risultati.

Contributo: 50F.26

UN MIMOTOPO SINTETICO KILLER, ATTIVO NEI CONFRONTI DI PATOGENI OPPORTUNISTI CORRELATI AD AIDS INIBISCE L'INFEZIONE ESOGENA ED ENDOGENA DI HIV

Luciano Polonelli* (*Università degli Studi di Parma*); Elisabetta Pilotti (*); Carlo Federico Perno (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Stefania Conti (*); Walter Magliani (*); Antonio Cassone (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Claudio Casoli (*)

Background: Un mimotopo killer (KP) è stato ingegnerizzato dalla sequenza di un decapeptide derivato da un anti-idiotipo ricombinante immagine interna di una tossina killer ad attività microbica nei confronti di microrganismi caratterizzati da uno specifico recettore parietale costituito essenzialmente da beta glucani. KP ha mostrato di esplicare un'attività microbica *in vitro*, neutralizzata da laminarina (beta 1-3 glucano) ma non da pustulano (beta 1-6 glucano) e/o *in vivo* nei confronti di *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Leishmania major*, *L. infantum*, *Achantamoeba castellanii*. KP ha mostrato una omologia di sequenza con la regione variabile di un anticorpo in grado di inibire l'attività fusogena del virus influenzale A in ambiente acido. KP ha mostrato di inibire la moltiplicazione di tale virus interferendo con la glicosilazione intracellulare dell'emoagglutinina. KP ha mostrato una omologia di sequenza con la poliproteina pericapsidica gp160 precursore di gp120 di HIV. Scopo di questo lavoro è la verifica della capacità di KP di inibire la replicazione di HIV-1.

Metodi: La tossicità di KP nei confronti di PBMC è stata valutata mediante un saggio citofluorimetrico che permette di discriminare tra cellule vitali, apoptotiche e necrotiche. Il saggio dell'attività di KP nei confronti di un ceppo di HIV-1 linfocitotropico (IIIB) e di uno monocitotropico (BaL), in presenza o meno di laminarina (beta 1-3 glucano) e pustulano (beta 1-6 glucano), è stato effettuato utilizzando monociti del sangue periferico (PBMC) ottenuti da pazienti infetti con HIV-1 e da individui sani, comparativamente ad AZT e a un peptide scramble costituito dagli stessi aminoacidi di KP disposti in diversa sequenza. La produzione virale è stata valutata nel soprannatante dei PBMC infetti mediante metodi convenzionali. Il saggio di internalizzazione del recettore (CD4) e corecettori (CCR5 e CXCR4) da parte di KP è stato effettuato mediante un saggio citofluorimetrico utilizzando una linea cellulare di osteosarcoma transfettata con CD4-CCR5 o CD4-CXCR4 e PBMC di donatori.

Risultati: KP non ha indotto processi tossici cellulari. La cinetica della produzione di RNA di HIV nelle colture di PBMC da pazienti infetti trattati con KP ha mostrato un decremento 10 volte maggiore di quello ottenuto mediante trattamento con AZT. L'attività di KP nei confronti di HIV-1 è risultata neutralizzata dalla presenza di laminarina ma non di pustulano. KP ha mostrato di inibire l'infezione esogena da HIV-1 (ceppi IIIB e BaL) anche nei PBMC di individui sani. KP ha mostrato di indurre la internalizzazione dei corecettori CCR5 e CXCR4 ma non di CD4.

Conclusioni: I risultati suggeriscono che KP agisca come un antagonista per i corecettori di HIV-1 prevenendone l'ingresso e la replicazione. KP ha mostrato di esplicare una attività diversificata *in vitro*, *ex vivo* e/o *in vivo* nei confronti dei più importanti agenti eziologici di infezioni opportunistiche e dell'agente eziologico di AIDS. KP si pone come prototipo molecolare di una nuova classe di farmaci per un approccio terapeutico e/o preventivo univoco e complessivo nell'ospite HIV-sieropositivo.

Contributo: 50F.27

ASPARTIL-PROTEASI E ANTIGENI DEGLI STADI INVASIVI DI *CRYPTOSPORIDIUM* E *TOXOPLASMA*: NUOVE MOLECOLE BERSAGLIO PER LO SVILUPPO DI CHEMIO- ED IMMUNO-TERAPIE

Fabio Tosini* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Furio Spano (*); Maria Angeles Gomez Morales (*); Alessia Possenti (*); Elisabetta Trasarti (*); Alessandra Ludovisi (*); Simona Cherchi (*); Marco Amati (*); Edoardo Pozio (*)

Background: Tra le infezioni opportunistiche di natura parassitaria, la criptosporidiosi (*Cryptosporidium* spp.) e la toxoplasmosi (*Toxoplasma gondii*) rappresentano ancora oggi un problema per la mancanza di una terapia di scelta per la prima e per la gravità ed elevata prevalenza della seconda. Nelle sue varie componenti sperimentali il progetto prevede: 1) l'analisi dell'attività anti-Toxoplasma degli inibitori della proteasi (IP) dell'HIV e l'identificazione di aspartil-proteasi di *T. gondii* e *Cryptosporidium* spp. quali potenziali target degli IP; 2) lo studio del ruolo delle proteine TgTRP-1 di *T. gondii* e Cpa135 di *C. parvum* nel processo di invasione; 3) lo sviluppo di una immunoterapia anti-*Cryptosporidium* diretta verso nuove proteine dello sporozoita.

Metodi: Obiettivo 1) Utilizzando una sequenza consensus derivata da aspartil proteasi note sono state analizzate anche dati genomiche di *C. parvum* e *T. gondii* utilizzando i programmi BLAST e SMART. Obiettivo 2) Per il clonaggio del cDNA di TgTRP-1 è stata analizzata una libreria fagica di tachizoiti di *T. gondii*. La regione 5' del cDNA è stata completata tramite 5' RACE. Frammenti proteici ricombinanti sono stati ottenuti tramite vettori per la produzione di proteine fuse a code di istidine. I mutanti di delezione della Cpa135 sono stati costruiti tramite PCR con primer specifici contenenti la sequenza per l'epitopo HA ed espressi in *Giardia duodenalis*. Obiettivo 3) Per la caratterizzazione antigenica dei peptidi SA35 e SA40, derivati rispettivamente dalle proteine Cpa135 e Gp900, gruppi di topi BALB/c di 8-12 settimane sono stati immunizzati s.c. con 10 µg dei peptidi ricombinanti.

Risultati: Obiettivo 1) Abbiamo identificato 7 geni di *C. parvum* e 4 di *T. gondii* codificanti per aspartil-proteasi. Attualmente stiamo analizzando l'espressione nei diversi stadi dei parassiti.

Obiettivo 2) La proteina TgTRP-1 è codificata da un cDNA di 4259 bp e consta di 969 aminoacidi. Questa nuova molecola è caratterizzata dalla presenza di due domini adesivi di tipo I della trombospondina, da una regione transmembrana C-terminale e da un dominio citoplasmatico acido. Dati preliminari ottenuti utilizzando anticorpi anti-TgTRP-1 indicano che questa proteina è localizzata nei micronemi degli stadi invasivi del parassita ed è probabilmente coinvolta nelle prime fasi del processo di invasione. Sono in corso esperimenti di "gene disruption" al fine di definire il ruolo funzionale di TgTRP-1. La Cpa135 presenta alcuni domini conservati in proteine secretorie dell'ospite. Per definire le interazioni molecolari in cui la Cpa135 è coinvolta sono stati costruiti dei mutanti di delezione per l'espressione in sistemi eterologhi. Oltre al gene Cpa135 sono stati identificati altri 14 geni che codificano per proteine immunogeniche espresse negli sporozoiti di *C. parvum*. Attualmente, stiamo analizzando la struttura delle proteine corrispondenti.

Conclusioni: L'identificazione in *C. parvum* e *T. gondii* di un distinto repertorio di aspartil-proteasi costituisce la premessa per lo sviluppo di inibitori specifici. Gli studi molecolari fin qui condotti sulle proteine TgTRP-1 e Cpa135 sembrano confermare che queste nuove molecole giocano un ruolo importante nel processo d'invasione. Ne consegue che l'identificazione della loro funzione potrà facilitare la messa a punto di nuove strategie di controllo immunologico e farmacologico.

Contributo: 50F/H

ANALISI DEI FATTORI DI RISPOSTA E TOLLERABILITÀ DELLA TERAPIA ANTI HCV IN PAZIENTI HIV+ E BASI RAZIONALI PER UN “TAYLORING” DEL TRATTAMENTO ANTI HCV IN PAZIENTI HIV+

Massimo Puoti (*Spedali Civili di Brescia*); Barbara Zanini; Salvatore Casari; Maria Giulia Antonimi

È stato condotto uno studio multicentrico su tollerabilità ed efficacia di una terapia triplice anti HCV con interferone ribavirina ed amantadina comparata con terapia standard con interferone e ribavirina in soggetti naïves e non responders a precedenti cicli di terapia con interferone. Gli studi hanno arruolato 112 pazienti complessivamente. Una risposta sostenuta alla terapia è stata ottenuta globalmente nel 24% dei pazienti trattati. Sono stati identificati come fattori predittivi di risposta il livello di GGT ed il genotipo HCV nei naïves, il livello di ALT e l'età nei “non responders”. Sono state analizzate le curve di decremento dell' HCVRNA che hanno identificato un potere predittivo negativo del 100% di non risposta nell'assenza di un decremento di 2 log dopo 12 settimane nei naïves e di 1 log dopo 4 settimane nei non responders. (Puoti *et al.* *Journal of Hepatology* 2004; 41: 312-8). È stato condotto uno studio comparativo verso soggetti HIV- stratificati per età, sesso, genotipo e viremia che ha comparato le cinetiche di decremento dell'HCVRNA nei due gruppi identificando una differenza nella cinetica di decremento di HCVRNA sia nella prima che nella seconda fase tra HIV+ e HIV-. Infine hanno terminato gli arruolamenti 2 studi mirati a valutare l'impatto della prosecuzione della terapia anti HCV per 6 mesi sulla percentuale di recidive in pazienti trattati con interferone peghilato e ribavirina. Gli studi hanno arruolato complessivamente 274 pazienti. Saranno presentati i dati relativi alla tollerabilità ed ai fattori predittivi di risposta a fine trattamento dello studio sui soggetti con infezione da genotipo HCV 2 e 3. Inoltre a latere della ricerca sono state confrontate le caratteristiche di 41 soggetti HIV+ con epatocarcinoma con due gruppi di controllo di 384 e 710 soggetti con epatocarcinoma HIV-. L'infezione da HIV è risultata associata in maniera indipendente a una maggiore invasività, alla confezione da HCV ed ad una minore sopravvivenza (Puoti M *et al.* *AIDS* 2004; 19: 2285-93).

Contributo: 50F.28

INFEZIONE OCCULTA DA HBV IN PAZIENTI CON COINFEZIONE HIV/HCV

G. Raimondo* (*Università degli Studi di Messina*); A. Cargnel (*Ospedale L. Sacco, Milano*); M. Levvero (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); T. Pollicino (*); G. Squadrito (*); G. Raffa (*); L. Costantino (*)

Background: Il nostro progetto di ricerca si prefigge di studiare l'impatto clinico e le possibili interazioni virologiche dell'infezione occulta da HBV in pazienti con coinfezione HIV/HCV. Questo argomento è di grande attualità e considerevole valenza scientifica come ribadito nel corso della recente "1st European Consensus Conference on HHV/HHV/HCV co-infections" (Parigi, 1-2 marzo 2005) e come confermato dal "commentary" a noi formalmente richiesto dall'editor in chief di The Lancet e recentemente pubblicato su detta rivista (Raimondo G, Pollicino T, Squadrito G. What is the clinical impact of occult hepatitis B virus infection? Lancet 2005;365:638-40). Per raggiungere gli obiettivi prefissati il progetto prevede sia indagini di epidemiologia molecolare su pazienti che studi *in vitro*.

Metodi: In origine, il programma prevedeva di analizzare per HBV occulto solo tessuti epatici congelati immediatamente dopo la biopsia. Benché questa procedura rimanga il gold-standard sotto molti aspetti e l'unica valida per isolare genomi virali interi da sottoporre ad ulteriori esperimenti *in vitro*, negli ultimi mesi il nostro laboratorio ha messo a punto una tecnica per la determinazione dell'HBV occulto in tessuti epatici fissati in formalina. Questa nuova procedura ci consente di allargare in modo significativo la casistica da esaminare per rispondere ai primi quesiti del nostro progetto, vale a dire: (a) determinazione della prevalenza di HBV occulto nelle diverse popolazioni di soggetti HIV/HCV positivi; (b) valutazione dell'interferenza di HBV occulto sulla risposta alla terapia con PEG-Interferone e Ribavirina in pazienti HCV positivi con coinfezione HIV. A questo scopo abbiamo già raccolto ed iniziato ad esaminare 70 campioni di tessuto epatico fissato (70%) o congelato (30%) di pazienti HIV/HCV positivi seguiti per lo più presso la II Divisione di Malattie Infettive dell'Ospedale L. Sacco di Milano, ma in parte anche presso altre unità di infettivologia collocate in aree diverse del territorio nazionale ed interessate a contribuire alla realizzazione del progetto scientifico. La raccolta della casistica – calcolata in circa 200 campioni – dovrebbe essere completata entro il mese di maggio p.v. in accordo con i tempi prefissati. Anche la parte *in vitro* degli esperimenti ha avuto inizio nei nostri laboratori.

Risultati: Considerando la complessità delle tecniche e le numerose procedure per garantire la specificità dei risultati, noi contiamo di avere dati sufficienti per una prima valutazione statistica circa la prevalenza dell'infezione occulta in pazienti HIV/HCV positivi entro 5-6 settimane. Per quanto riguarda gli esperimenti *in vitro*, abbiamo già isolato, amplificato e clonato genomi virali interi di HBV da biopsie epatiche congelate di 4 pazienti. Il sequenziamento di 10 cloni per ciascun caso è in fase avanzata di esecuzione.

Conclusioni: A distanza di un anno dalla presentazione del progetto, il programma di lavoro è già in fase avanzata di attuazione. L'interesse in campo internazionale sull'argomento conferma in pieno la validità scientifica di questo progetto di ricerca. Peraltro, i risultati preliminari sembrano indicare che esso fornirà informazioni preziose e sicuramente originali per una migliore comprensione dei meccanismi eziopatogenetici che sottendono a quel complesso quadro che è la patologia epatica nei pazienti con infezione da HIV, condizione questa indispensabile per l'individuazione degli approcci terapeutici più corretti.

Contributo: 50F.29

RUOLO DELLE POMPE DI EFFLUSSO NELLA RESISTENZA AGLI AZOLI E NELLA VIRULENZA DI LIEVITI PATOGENI

Maurizio Sanguinetti (*Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Brunella Posteraro; Riccardo Torelli; Marilena La Sorda; Giovanni Fadda

Background: Il lavoro del presente progetto di ricerca è incentrato sullo studio delle basi molecolari di resistenza in *Candida glabrata*, patogeno emergente resistente agli azoli, allo scopo di determinare se i meccanismi molecolari finora descritti siano sufficienti a spiegare il fenotipo di azolo-resistenza in ceppi clinici di *C. glabrata*, o se altri, non ancora stabiliti, meccanismi possano essere implicati. In parallelo, è stato valutato il ruolo del gene *CnAFR1*, che codifica per una pompa di efflusso di *Cryptococcus neoformans*, da noi identificata quale responsabile della resistenza al fluconazolo, nella virulenza, attraverso lo studio comparativo di un set di ceppi isogenici, costituito da un ceppo wild-type, sensibile al fluconazolo, e da due ceppi derivativi, di cui uno con il gene *CnAFR1* distrutto e l'altro in grado di superesprimere stabilmente *CnAFR1*.

Metodi: Ceppi. I 29 ceppi di *C. glabrata* analizzati derivano da una collezione di ceppi clinici ottenuti da singoli pazienti nel corso di una sorveglianza ospedaliera dell'antibiotico-resistenza. Venti erano resistenti e 9 sensibili dose-dipendenti al fluconazolo. Il ceppo di *C. neoformans* BPY22 è un ceppo sensibile al fluconazolo isolato dal liquido cefalo-rachidiano di un paziente affetto da criptococcosi. Tale ceppo è stato usato per ottenere i mutanti derivativi BPY444 (in cui *CnAFR1* è stato deletato) e BPY445 (che superesprime *CnAFR1*, opportunamente posto sotto il controllo del promotore *gpd1* di *C. neoformans*). Analisi quantitativa di espressione genica. L'espressione quantitativa dei geni *CgCDR1*, *CgCDR2*, *CgSNQ2* e *CgERG11* di *C. glabrata* è stata eseguita mediante RT-PCR real-time. Per ciascun ceppo, gli incrementi di espressione sono stati determinati dall'espressione media normalizzata (rispetto al gene *URA3*) relativa all'espressione media normalizzata di un ceppo sensibile di controllo. Modelli di criptococcosi murina. Per l'infezione sistemica, 10 topi BALB/c sono stati infettati mediante iniezione nella vena della coda con 1×10^6 cellule dei ceppi BPY22, BPY444 e BPY445. Per l'infezione attraverso il tratto respiratorio, 10 topi sono stati infettati per via inalatoria con 5×10^4 cellule dei ceppi su citati. I dati di sopravvivenza sono stati analizzati mediante il test di Kruskal-Wallis.

Risultati: Le analisi di RT-PCR quantitativa hanno dimostrato che *CgCDR1* e *CgCDR2*, singolarmente o in combinazione, erano superespressi ad alti livelli in tutti i 20 tranne due ceppi di *C. glabrata* studiati e, ad un minor grado, nei 9 ceppi sensibili dose-dipendenti. Inoltre, incrementi di espressione sono stati osservati per *CgSNQ2* (che codifica per un ABC-transporter non ancora associato alla azolo-resistenza) in 8 dei 29 ceppi studiati. I due ceppi che esprimevano livelli normali di *CgCDR1* e *CgCDR2* esibivano, invece, incrementi nei livelli di *CgSNQ2*. Al contrario, l'analisi del gene *CgERG11* ha rivelato l'assenza di mutazioni o di superespressione in tutti i ceppi, suggerendo che *CgERG11* non è coinvolto nell'azolo-resistenza. Riguardo al ruolo del gene *CnAFR1* nella virulenza di *C. neoformans*, il ceppo BPY445 che superesprime *CnAFR1* era significativamente più virulento del ceppo wild-type BPY22, come risulta dai dati di sopravvivenza in entrambi i modelli di infezione intravenosa e inalatoria, mentre vi erano differenze significative tra i gruppi di topi infettati con BPY444 e wild-type solo nel modello inalatorio.

Conclusioni: Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano che la superespressione delle pompe di efflusso *CgCDR1*, *CgCDR2* e *CgSNQ2* è in grado di spiegare la resistenza agli azoli nei ceppi di *C. glabrata* studiati, e che *CnAFR1*, quando superespresso, è implicato nella virulenza di *C. neoformans*.

Contributo: 50F.31

VALUTAZIONE DI NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI NELLE MICOSI OPPORTUNISTICHE AIDS ASSOCIATE

Francesco Barchiesi* (*Università Politecnica delle Marche*); Elisabetta Spreghini (*); Monia Maracci (*); Anna Marigliano (*); Giorgio Scalise (*)

Background: Le micosi hanno da sempre rappresentato le infezioni opportunistiche più frequenti nel soggetto affetto da AIDS. Nel corso di questi anni si è assistito ad un significativo aumento del fenomeno di resistenza farmacologica da parte dei lieviti isolati da questi soggetti. L'obiettivo principale del nostro progetto è quello di valutare nuovi approcci terapeutici anti-infettivi per le micosi opportunistiche AIDS associate.

Metodi: L'efficacia di diversi farmaci antimicotici, da soli ed in combinazione, è stata valutata attraverso esperimenti condotti *in vitro* ed *in vivo*. I primi sono stati effettuati tramite metodiche standard (es.: NCCLS), la disco diffusione e le curve di killing. Per gli esperimenti *in vivo* sono stati utilizzati modelli murini (topi CD1 immunocompetenti o neutropenici). Gli effetti delle varie interazioni sono stati analizzati attraverso le curve di sopravvivenza o tramite la conta delle UFC nel tessuto cerebrale o polmonare (criptococcosi) o renale (candidosi). Più in particolare abbiamo studiato gli effetti: 1. della combinazione posaconazolo (POS) + amfotericina B (AMB) nei confronti di *Cryptococcus neoformans*. 2. della terapia sequenziale caspofungina (CAS) / fluconazolo (FLC) nei confronti di *Candida albicans*. 3. della combinazione voriconazolo (VOR) ed altri tre farmaci nei confronti di *C. glabrata*. 4. della combinazione CAS + AMB nei confronti di *C. glabrata*.

Risultati: 1. Il principale effetto di questa combinazione si traduce in una riduzione del burden tissutale piuttosto che in un prolungamento della sopravvivenza. Questo effetto è particolarmente evidente nel tessuto cerebrale (Barchiesi *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 3312-6). 2. CAS seguita da FLC è efficace tanto quanto CAS somministrata per lo stesso periodo di tempo. Un vantaggio di questo approccio terapeutico è la possibilità di passare da una terapia endovenosa ad una orale con enormi vantaggi sia per il paziente che economici (Barchiesi *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48, 4056-8). 3. L'attività di VOR aumenta dopo combinazione con altri farmaci che hanno differenti meccanismi di azione e/o che posseggono target diversi nel sistema di sintesi dell'ergosterolo. Più in particolare, VOR + AMB si comporta in maniera sinergica mentre VOR + flucitosina possiede un'attività fungicida (Barchiesi *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48, 3317-22). 4. Questa combinazione non solo è più efficace di ciascun farmaco usato in monoterapia ma si dimostra l'unico regime terapeutico in grado di determinare una sterilizzazione dell'organo (Barchiesi *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* In press).

Conclusioni: I nostri dati delucidano gli effetti di innovativi schemi terapeutici potenzialmente utilizzabili nella pratica clinica.

Contributo: 50F.32

CARCINOMA DEL POLMONE NELL'ERA PRE- E POST-HAART

Alessandra Bearz* (CRO, Aviano); Michele Spina (*); Massimiliano Berretta (*); Emanuela Vaccher (*); Umberto Tirelli (*)

Background: La casistica GICAT dei tumori associati ad HIV, aggiornata al settembre 2003, è costituita da 2681 casi, di cui 383 sono tumori solidi (TS). Centoquarantasette casi sono neoplasie dell'apparato geniturinario (83 casi di carcinoma della cervice), 88 dell'apparato gastroenterico-fegato, 70 dell'apparato respiratorio e mediastino, 30 della regione ORL e 48 casi di neoplasie miscellanee. Considerando il notevole numero di fumatori tra i pazienti con infezione da HIV, è facile prevedere che il cancro del polmone sarà uno dei tumori più frequenti ed in aumento nell'era HAART.

Metodi: Per valutare l'impatto dell'HAART sulla storia naturale di questa malattia, sono stati valutati in modo retrospettivo 61 casi di carcinoma del polmone associato ad HIV, diagnosticati nell'ambito del GICAT. Tutti i pazienti sono stati diagnosticati fra il 1986 e il 2003. Le caratteristiche cliniche d'esordio e l'outcome dei 34 (54%) casi diagnosticati nell'era pre-HAART (<1996) sono stati confrontati con i 27 (44%) casi dell'era post-HAART (1997-2002). Le principali caratteristiche differenziali dei due gruppi sono riportate in tabella:

	Pre-HAART 86-96 n. (%)	Post-HAART 97-02 n (%)
n. tot	34 (56)	27 (44)
Età mediana anni	39	45
Istologia: NSCLC	25 (74)	25 (93)
Adenocarcinoma	12 (35)	13 (48)
Stadio III-IV	24 (71)	22 (81)

Risultati: La chemioterapia e la sopravvivenza sono riportate in tabella:

	Pre-HAART 86-96 n. (%)	Post-HAART 97-02 n (%)
Terapia: Nessuna	8 (24)	1
Chemioterapia	16 (47) [°]	21 (88) [°]
Sopravvivenza globale mediana, mesi	3,8*	7*
Sopravvivenza cancro-specifica mediana, mesi	4#	7#

[°]p=0.04; *p=0.008; #p=0.02: NSCLC = non small cell lung cancer.

Conclusioni: Le caratteristiche cliniche d'esordio del carcinoma del polmone associato ad HIV dell'era post-HAART sono risultate simili a quelle del pre-HAART.

Contributo: 50F.33

TERAPIA CON CHEMIOTERAPIA ED HAART NEL SARCOMA DI KAPOSÌ AVANZATO

Emanuela Vaccher* (*CRO, Aviano*); Giampiero Di Gennaro (*); Ornella Schioppa (*); Ferdinando Martellotta (*); Umberto Tirelli (*)

Background: Con l'avvento dell'HAART, le possibilità terapeutiche nel sarcoma di Kaposi, anche nella malattia avanzata si sono modificate. Scopo di questo studio è di valutare l'efficacia di una combinazione di chemioterapia ed HAART nella malattia avanzata.

Metodi: Il taxolo (TAX) e la vinorelbina (VNB) sono due farmaci singolarmente attivi nel sarcoma di Kaposi (SK). La somministrazione concomitante del TAX e della VNB ha dimostrato un'attività citotossica in linee cellulari di tumori umani. Con questo razionale il GICAT ha attivato uno studio di fase II con TAX 100 mg/m² giorno 1 e VNB 25 mg/m² giorno 1 e.v., in combinazione con HAART e con il supporto del G-CSF, somministrati con ritmo trisettimanale. Eleggibili per lo studio erano i pazienti (totale 48 casi) con SK esteso e/o rapidoproliferante. Il 24% di essi era stato pretrattato con terapia antiblastica, ma tutti erano naive per TAX o VNB. All'arruolamento la conta mediana dei CD 4 era di 163/microL (range 3-915) e la viremia HIV era 10.200 cp/ml (range >50->500.000). Il numero mediano dei cicli somministrati è stato di 4 e l'85% dei pazienti è stato trattato con HAART concomitante alla CT.

Risultati: Il tasso di remissione completa (RC) è risultato pari al 6% (durata mediana 26+ mesi) ed il tasso di remissione parziale (RP) 62% (risposta globale 68%), il 15% dei pazienti ha presentato stabilità di malattia ed il 21% progressione. Le principali tossicità, valutate secondo WHO, sono risultate leucopenia (G1-G2 24%, G3-G4 46%), anemia (G1-G2 37%, G3-G4 29%), piastrinopenia (G1-G2 24%, G3-G4 20%), nausea-vomito (G1-G2 24%, G3-G4 2%), mucosite (G1-G2 2%, G3-G4 15%), neuropatia periferica sensitivo-motoria (G1-G2 10%), neuropatia autonoma (G1-G2 5%, G3 5%), renale (G1-G2 12%, G3 2%) e tossicità epatica (G1-G2 12%, G3-G4 5%). Un paziente è deceduto dopo un ciclo di CT-HAART per tossicità ematologica, renale ed epatica di grado 4. Il tempo mediano di progressione è stato di 12+ mesi (range 3 - 48+). La sopravvivenza mediana è risultata di 8.5+ mesi (range 1+ - 48.5+) e la progressione del SK è stata la principale causa di morte, documentata nel 54% dei pazienti.

Conclusioni: I risultati di questo studio suggeriscono che nell'era HAART la combinazione di VNB-TAX ed HAART è attiva nell'SK avanzato, con una tossicità globalmente accettabile e fornisce una durata di risposta discretamente lunga. Comunque il tasso di risposta sembra sovrapponibile a quello ottenuto con il TAX in monochemioterapia.

Contributo: 50F.34

AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTATION AS SALVAGE REGIMEN IN PATIENTS WITH RELAPSED/REFRACTORY HIV-ASSOCIATED LYMPHOMA IN THE HAART ERA A SINGLE CENTER EXPERIENCE

Mariagrazia Michieli* (*CRO, Aviano*); Maurizio Rupolo (*); Michele Spina (*); Cecilia Simonelli (*); Giampiero Di Gennaro (*); Luciano Abbruzzese (*); Mario Mazzuccato (*); Valter Gattei (*); Luigi De Marco (*); Emanuela Vaccher (*); Umberto Tirelli (*)

Background: The treatment of HIV associated lymphoma (HIV-Ly) has changed since the introduction of HAART. However, for patients with relapsed/refractory (R/R) disease, second line chemotherapeutic regimens still offer little chance of long-term survival. A previous report of some of us (*J Clin Oncol* 21; 4423, 2003) demonstrated that high dose chemotherapy (HDC) is feasible in selected cases, although HIV pts with R/R lymphomas often showed comorbidities representing exclusion criteria for ASCT.

Methods: From November 2001 until January 2005, 32 patients affected by R/R HIV-Ly (7 HD and 25 NHL) were enrolled in this study. The GICAT (Italian Cooperative Group AIDS and Tumors) criteria for inclusion in the ASCT protocol were as follows: PS<3 WHO, ventricular ejection fraction >50%, creatinine <2 mg/mL, bilirubin <3 mg/mL, absence of opportunistic infections (OIs) severe or active, not CNS lymphoma, ongoing HAART and CD4>100 uL, unless chemotherapy-related.

Results: Twenty (62 %) patients were males and 4 (38 %) were females, M/F ratio of 7:1, median age was 40 (28-66), 25 (78%) patients were non-Hodgkin lymphoma (NHL) and 7 (22%) Hodgkin's disease (HD). Three patients (9 %) had HBV chronic hepatitis, and 13 (40%) HCV chronic infection. CD4+ median count was 140 uL (4-460), HIV viral load was <50 cp/uL for 20 pts (57%). The number of patients having at least one major exclusion criteria for ASCT was 14/32 (44%), the main exclusion criteria being the presence of opportunistic infection (10 patients, 31%). Despite the presence of at least one major exclusion criteria, we treated all population with a second line chemotherapy and 13 (41%) had at least a partial response. On the basis of the chemosensitivity, 13/32 received the same treatment, while, by strictly following the GICAT criteria, only 8 pts should have received an ASCT. The additional 5 patients treated with ASCT had OIs (3 pts), hepatic failure (1 patient), renal failure (1 patient). No patient died by ASCT. The projected 3-year overall survivals were 82% and 15% for cases undergoing or not ASCT, respectively. The 3-year projected OS of the entire population was 44%.

Conclusions: Because of the lack of effective salvage therapies other than ASCT in HIV-Ly with R/R diseases and based on the absence of ASCT related-mortality observed in our cases, we suggest that the presence of OIs or other moderate comorbidities should no longer be considered exclusion criteria preventing the use of ASCT in poor prognosis HIV patients.

Grant: 50F.35

IL POLISACCARIDE CAPSULARE DI *C. NEOFORMANS* INDUCE L' ESPRESSIONE DEL FASL IN MACROFAGI UMANI

Claudia Monari* (*Università degli Studi di Perugia*); Eva Pericolini (*); Francesco Bistoni (*); Anna Vecchiarelli (*)

Background: Il *Cryptococcus neoformans* è un saprofito ambientale ubiquitario che entra nell'organismo umano in seguito ad inalazione e la sua localizzazione primaria è il polmone. Tale fungo è un patogeno opportunista responsabile di gravi patologie nell'ospite immunocompromesso. Negli ospiti immunocompetenti l'infezione rimane localizzata a livello polmonare e si risolve rapidamente. Negli ospiti con compromissione dell'immunità cellulare, specialmente in pazienti affetti da AIDS, l'infezione si diffonde ai vari organi e in particolare al sistema nervoso centrale. Con l'avvento della pandemia da virus HIV l'importanza di questo patogeno opportunista è cresciuta considerevolmente. Infatti, la criptococcosi colpisce circa il 10% dei malati di AIDS e spesso è fatale. Nonostante le nuove terapie anti-retrovirali abbiano ridotto l'incidenza delle infezioni criptococciche, la criptococcosi rimane un serio problema in Asia e in Africa dove il 30% dei pazienti AIDS contrae tale infezione. Il principale fattore di virulenza di *C. neoformans* è la capsula polisaccaridica che è formata principalmente da glucuronoxilomannano (GXM). Tale sostanza è stata ritrovata abbondantemente nei fluidi biologici di pazienti affetti da criptococcosi e possiede potenti attività immunosoppressive. Poiché in un precedente lavoro abbiamo dimostrato che GXM era in grado di inibire la linfoproliferazione, ci siamo chiesti se tale fenomeno era ascrivibile alla capacità di GXM di indurre apoptosi dei linfociti T.

Metodi: Le cellule mononucleate (PBMC) sono state separate da sangue venoso eparinizzato di donatori sani mediante centrifugazione su gradiente di densità con Ficoll-Hypaque. I PBMC ottenuti sono stati distribuiti in coltura in piastre Petri ed incubati per 1 h a 37°C. Le cellule aderenti, monociti, sono state coltivate in presenza di GM-CSF per ottenere i macrofagi. Le cellule non aderenti sono state trattate con anticorpi monoclonali anti CD3 coniugati con microbeads per ottenere i linfociti T purificati. Le cellule purificate (macrofagi e linfociti T) sono state trattate *in vitro* con GXM e l'analisi fenotipica è stata fatta mediante analisi citofluorimetrica utilizzando anticorpi monoclonali specifici.

Risultati: I risultati ottenuti da questo studio dimostrano che: 1) GXM purificato induce nei macrofagi un immediato e duraturo incremento dell'espressione del Fas Ligand (FasL); 2) tale aumento è dovuto all'induzione di nuova sintesi di FasL e all' incremento della traslocazione di tale recettore verso la superficie cellulare; 3) questo effetto è in parte ascrivibile all' interazione del GXM con il TLR4; 4) la up-regolazione del FasL si osserva esclusivamente in macrofagi che hanno internalizzato il GXM; 5) tali macrofagi inducono l' apoptosi delle cellule T attivate che esprimono il Fas e di cellule Jurkat che costitutivamente esprimono il Fas; 6) l'utilizzo di anticorpi anti-Fas inibisce l' apoptosi indotta da GXM.

Conclusioni: In conclusione i nostri risultati rivelano nuovi aspetti delle proprietà immunoregolatorie del GXM e suggeriscono che questo composto solubile e non tossico possa avere potenziali applicazioni terapeutiche che sfruttino "death receptors" come obiettivi molecolari chiave nella regolazione della citotossicità cellulo-mediata, della omeostasi immune, e della immunopatologia delle malattie.

Contributo: 50F.36

VALIDAZIONE PROSPETTICA DI UNO SCORE DI GRAVITÀ CLINICA NELLE POLMONITI DI COMUNITÀ (CAP) IN SOGGETTI HIV+

Pierluigi Viale* (*Clinica delle Malattie Infettive, Policlinico Universitario di Udine*); Luigia Scudeller (*) (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Giampiero Carosi (*Clinica delle Malattie Infettive, Università degli Studi di Brescia*)

Background: Nonostante le CAP rappresentino un problema significativo nella gestione dell'infezione da HIV, esse non sono state oggetto di studi finalizzati a valutarne gli indicatori prognostici ed i criteri di outcome. Il ricorso ad uno score basale di gravità predittivo dell'outcome, configura la possibilità di mediare l'aggressività gestionale, con evidenti ricadute sul contenimento delle indicazioni a ricovero e sulla razionalizzazione dell'impiego di risorse. Analogamente definire ed applicare il concetto di stabilizzazione clinica come parametro di outcome consente uno standard gestionale più corretto perché fondato su dati statisticamente validati.

Metodi: Studio osservazionale in 2 fasi, la 1^a finalizzata a verificare le caratteristiche cliniche delle CAP in HIV, ad acquisire le variabili su cui costruire lo score predittivo di outcome e a definire il valore della stabilità clinica come parametro di outcome. Dopo derivazione dello score predittivo, la fase 2 è volta a validare lo stesso prospetticamente. Lo score predittivo è stato derivato in due fasi: Fase A, disegnata per identificare pazienti a basso rischio di non guarire, basandosi solamente su variabili ottenibili dall'anamnesi e dall'esame obiettivo (i pazienti senza alcuna delle variabili identificate in questa fase sono stati assegnati alla classe di rischio 1) e fase B (il rischio di non guarire è stato quantificato con le stesse variabili della fase A più variabili radiologiche e di laboratorio). I fattori predittivi di mancata guarigione sono stati identificati con modelli di regressione logistica multivariata. Per generare punteggi semplici costituiti da numeri interi, i Log OR del modello finale ottenuto sono stati arrotondati all'unità più vicina, e un punteggio totale è stato ottenuto sommando i singoli punteggi. Il cut-off tra le classi di rischio 2 e 3 era stato definito come il più alto punteggio totale a cui la proporzione cumulativa di pazienti che non guarivano rimaneva <10%. Il rischio di non guarire è stato poi calcolato in ciascuna delle tre classi.

Risultati: Sul 437 pazienti arruolati nella fase 1, le variabili predittive di outcome sfavorevole sono state: sesso femminile, malattie concomitanti, status mentale alterato, Karnofsky <70, FR>20/min, PAS<90 mmHg, polmonite multilobare, neutrofili <1000/mmc, CD4+<100 cells/mmc. Il punteggio mediano ottenuto è stato 3 (IQR 2-5, range 0-14). I pz. con punteggio totale <4 sono stati assegnati alla classe di rischio 2, quelli con punteggio >5 alla classe di rischio 3. Su 397 pazienti valutabili, 15.6% sono stati assegnati alla classe di rischio 1, 60.0% alla classe 2 e 24.4% alla classe 3. Il rischio di non guarire è risultato 0% nella cl. 1, 1.3% nella 2 e 30.9% nella 3. Il tempo medio di stabilizzazione è risultato pari a 6 gg. (IQR 3-10) per la definizione più conservativa. Dopo raggiungimento della stabilità clinica solo 8 pazienti sono andati incontro a ricaduta clinica e di questi nessuno è deceduto.

Conclusioni: Appare evidente che l'applicazione routinaria di uno score prognostico potrebbe rendere possibile una reale stratificazione dei pazienti in base al rischio, ed un utilizzo più razionale delle risorse diagnostiche e terapeutiche. Secondariamente la stabilità clinica si configura come un parametro altamente affidabile per la valutazione dell'outcome, postulando la possibilità di un confronto più accurato delle strategie gestionali nei futuri studi clinici.

Contributo: 50F.37

Progetto
Azione concertata italiana per lo sviluppo
di un vaccino contro HIV/AIDS (ICAV)

Responsabili scientifici

Dr.ssa Barbara ENSOLI e Prof.ssa Paola VERANI

DEVELOPMENT AND STANDARDIZATION OF TECHNIQUES AND DIAGNOSTIC ASSAYS AND PREPARATION OF STANDARD OPERATING PROCEDURES (SOPS) FOR VACCINE TESTING IN ANIMAL MODELS AND HUMANS FROM DEVELOPED AND DEVELOPING COUNTRIES

F. Mazzetta* (*Cattedra di Medicina Interna e Immunologia Clinica, Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); W. De Santis (*); R. Carello (*); M. L. Bernardi (*); M. Marziali (*); W. Leti (*); C. Gramiccioni (*); F. Ensoli (*IRCCS S. Gallicano, Roma*); A. Isgrò (*); F. Aiuti (*)

Background: For evaluating the immunological effects of vaccination against HIV it is important to develop, validate and standardise operating procedures both in animal model and in humans. This is critical in order to obtain clear and comparable readouts in a multicentric context and represent the basis for future transfer of technology to developing countries.

Methods: The phenotypic and functional assessment of T cells has been comparatively determined in a group of healthy donors in order to generate a standard reference database of the Italian population. CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets and TCRBV repertoire were evaluated using Flow Cytometry analysis. The third complementarity determining region (CDR3) profile of the TCR beta chain was analyzed with the spectratyping technique and sequence analysis. To evaluate the function of T cells, *in vitro* lymphoproliferative responses (LPR) to CD3 mAb OKT3, PHA and mannoprotein (MP) of *Candida albicans* were performed.

Results: To date, 10 healthy subjects were studied. Naive and memory T cells were investigated by evaluating the differential expression of CD45RA and CD62L molecules on both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The co-expression of CD31 on CD4⁺CD45RA⁺ characterises thymic naive T cell subset. In our subjects, the mean value of CD4⁺/CD45RA⁺CD62L⁺ was 49±10% (516±188 cells/mmc), while CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ cells were 35±11% (344±117 cells/mmc). The mean value of memory T CD4⁺ cells was 50±10% (510±138 cells/mmc); on the CD4⁺ T cells the expression of HLA-DR was 6±2% (60±20 cells/mmc) and of Fas was 50±11% (492±146 cells/mmc). Of the CD8⁺ T cells 17±9% (77±61 cells/mmc) expressed HLA-DR and 49±10 (228±140) expressed Fas. 20 anti-TCR BV mAbs were used to stain unfractionated T cells. Values greater than 3 SD above the mean of controls will be used to establish skewed use of BV gene families by CD8 and CD4 T cells. Amplifications of target cDNA from CD4 and CD8 T cells were performed with 24 TCRBV specific primers. A standard profile, representing the non perturbed repertoire, was determined for each BV by calculating the average distribution of the corresponding CD4 and CD8 profiles from 5 of the healthy subject. The TCR repertoire perturbation per BV family was defined as the sum of SD of percentage of each sample's CDR3 length. Mean SI (Stimulation Index) obtained with OKT3 stimulation was 78.2, while mean SI with PHA stimulation was 109.6. 3H-TdR incorporation in unstimulated 3-day cultures was low in all controls (range 150-728 ct/min). Mean SI obtained with MP stimulation was 27.4 (range 2.2-83.3 ct/min). 3H-TdR incorporation in unstimulated 6-day cultures ranged from 295 to 2469 ct/min. LPR to anti-CD3 mAb and PHA was considered conserved for SI>15 and 25, respectively. LPR to recall Ag MP was considered significant for SI>5.

Conclusions: The technical approach utilised in the present study appears a useful tool to evaluate standard immune parameters in HIV disease and may prove helpful in vaccine testing in humans. The next step of this study is directed to generate a more comprehensive database of the target population(s) and to standardise these technique for future technology transfer to developing countries.

Grant: 45F.1

INNATE IMMUNITY IN MACACA MODEL: CHARACTERIZATION OF DEFENSIN PLASMA LEVELS IN HEALTHY ANIMALS

Silvia Baroncelli* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Donatella R. M. Negri (*); Claudia Rovetto (*); Roberto Belli (*); Fausto Titti (*); Andrea Cara (*); Barbara Ensoli (*)

Background: Defensins are described as a family of peptides playing an important role in innate immunity. Recent studies have shown that defensins exhibit a broad spectrum of antimicrobial activities against bacteria, fungi and enveloped viruses including HIV. The mechanism of the anti-HIV activity of defensins is under investigation, but it seems that defensins act as a potent immunological adjuvant, suggesting they may be useful for the formulation of a vaccine against AIDS. α -defensins exhibit their anti-HIV activity on at least two levels; directly inactivating virus particles and affecting the ability of CD4 cells to replicate the virus. Defensins are evolutionary conserved between different primate species. The high homology found between defensins in *Macaca* species and *Homo sapiens* suggested that innate immune responses in nonhuman primates are very similar to those in humans. The aim of present work was to characterize the expression of defensins in healthy and in SHIV-infected *Macaca fascicularis*, an animal model successfully used to test candidate HIV vaccines. To determine the suitability of the defensin ELISA for clinical studies, we measured defensin concentrations in the plasma of healthy monkeys, that were monitored in a longitudinal study designed to characterize physiological fluctuations.

Methods: *Cynomolgus* monkeys (*Macaca fascicularis*) were used in the present study. Clinical evaluations, cytofluorimetric, hematoclinical analysis and weight measurements were recorded monthly when blood samples were collected. Defensin levels in plasma were measured by using the enzyme immunoassay Hbt HNP 1-3 ELISA test kit following manufacturer's instructions. The plasma samples were analyzed in duplicate, and all samples from the same individual were run on the same plate to minimize variations due to technical differences.

Results: Plasma defensin levels were measured in 48 adult healthy animals (*Macaca fascicularis*), 16 females and 32 males; all these monkeys resulted free from retrovirus (SIV, SRV, STLV) and from HBV, CMV and Herpes B infections. Males showed a defensin plasma levels double with respect to female values. Median value in females was 120.4 pg/ml (mean 138.7 \pm 85.8), while in males was 241.1 pg/ml (mean 254.6 \pm 141.5). No correlations with leucocyte counts nor CD4 and CD8 cell level were recorded. To define the physiological fluctuations in defensin levels, a cohort of 12 healthy adult males was analyzed for a 5 months period. Analysis was repeated three times at 0, 9 and 20 weeks. Variations in the leucocyte counts, as well as physiological changes in neutrophils and in CD4+ and CD8+ cells do not affect the plasma levels of defensins.

Conclusions: In *macaca*, defensin plasma concentration seem to be a stable parameter, and intraindividual variations in healthy animals were maintained in a restricted range during time. Slight physiological variations in the total number of leucocyte count, neutrophils and in CD4+ and CD8+ cells do not affect the plasma levels of defensins. Interestingly we found that individual fluctuations in defensin plasma levels were lower than inter individual differences. These observations confirm previous findings in human on the minimal fluctuations in defensin plasma levels in physiological conditions. In next phase we will assess the potential role of defensins during the acute phase of SHIV infection in *macaca* inoculated by different routes.

Grant: 45F/C

STUDY OF SHIV-243 TAT AND ENV GENES VARIABILITY FOLLOWING VACCINATION OF CYNOMOLGUS MONKEYS WITH THE TAT PROTEIN

Barbara Ridolfi* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Tulio De Oliveira (*University of Oxford*); Maria Teresa Maggiorella (*); Leonardo Sernicola (*); Domenico Fulgenzi (*); Stefano Buttò (*); Alessandra Borsetti (*); Barbara Ensoli (*)

Background: Our previous studies suggested that a Tat-based vaccine may control virus replication and transmission and can block disease and/or progression in five out of seven vaccinated macaques. During replication in the presence of tat vaccination, mutations might have taken place in some of the viral quasi species leading to the selection of more pathogenic variants. In this study, we wanted to evaluate the possible presence of viral variants of tat and env genes, during the acute and chronic phases of infection, analyzing SHIV-243 virus derived from two out of seven vaccinated infected macaques and from control monkeys and compare them to the parental virus.

Methods: Sequential samples were collected over a period of 71 weeks from vaccinated and control monkeys. SHIV variation over time, were studied by analyzing tat and C2-V3 env sequences after DNA extraction from PBMCs or lymphnodes, DNA-PCR amplification and sequencing 5 clones at different time points (2, 10, 41, 71 weeks after challenge).

Results: No significant differences were observed in mutation frequencies among the two groups, although there was an higher proportion of synonymous substitutions especially in the second exon of the tat gene. In the control monkeys, point mutations in the first tat exon were distributed especially in the core region between aa30-50, conversely vaccinated infected macaques presented point mutations at the NH₂-terminal of the protein. In the second exon of tat, point mutations were scattered along the sequence. Analysis of C2-V3 envelope regions showed that sequence variation is due to positive selection. Sixteen out of 21 mutations that appeared at nucleotide level caused aminoacid change. One of these mutations causes the appearance of an extra glycosylation site that is commonly conserved in B subtype.

Conclusions: In general we found low sequence variability in the tat gene in all viral clones sequenced during follow-up studies. This result suggests that HIV-1 Tat sequence is sufficiently conserved to provide a non-polymorphic antigen for immunization. This study is currently analyzing the env V3 variants by introducing these mutations into the pSVIII envelope expressor plasmid to address the biological and molecular characteristic of the mutant viruses.

Grant: 45F/C

WP8, TASKS 1, 2, 3 PREPARATORY STUDIES IN SWAZILAND AND SOUTH AFRICA FOR PHASE II CLINICAL TRIALS WITH CANDIDATE ANTI-HIV/AIDS VACCINES

Stefano Buttò* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Daniela Bernasconi (*); Michele Chiappi (*); Eftyhia Vardas (*CHBH, Johannesburg*); Barbara Ensoli (*)

Background: The worst affected region by HIV is sub-Saharan Africa, where 29.4 million people are living with HIV/AIDS. In South Africa the HIV prevalence rate is estimated around 15.4% and in Swaziland is close to 39%. This picture claims for an urgent action against virus spreading, such as the development of a vaccine against HIV/AIDS. Within ICAV, different vaccine approaches are being studied. The most promising ones will be tested in phase I trials in Italy. If safe, these vaccines could be suitable for phase II clinical trials in Africa. However, before trials with candidate vaccines are undertaken in Africa, preliminary investigations need to be done. These include: to build up site infrastructure and to train the local and clinical laboratory personnel to increase site capacity; to identify and prepare cohorts suitable for vaccine trials by conducting epidemiological and feasibility studies in the target populations; to investigate the extent of cross-clade immune recognition of vaccine antigens; to evaluate HIV diversity. Mostly important, training of qualified investigators is key to clinical trial development. Therefore, the main objective in the first year is to establish mechanisms of collaboration and exchange of expertise between participants involved in the project and to strengthen the appropriate capacity at each South African and Swazi site.

Methods: Dedicated Italian personnel has been working in Swaziland for training of the in loco personnel in the specifics of HIV vaccine work. Sera from about 2000 pregnant women have been collected in Swaziland for prevalence and incidence studies. Other sera are being collected in South Africa at the Chris Hani Baragwanath Hospital (CHBH) in Johannesburg. Prevalence studies are performed by anti-HIV commercial Elisa tests, whereas incidence is estimated by the Avidity Index (AI) assay with the AxSYM HIV1/2gO kit. Validation of AI assay for non B subtypes is being performed on 120 already available sera samples from Ugandan individuals infected with different HIV subtypes and with known seroconversion dates.

Results: A laboratory of virology has been set up in Mbabane (Swaziland). A first mission of Italian personnel (July 2004) defined the needs for the specifics in the vaccine trial planning. Procedures for PBMCs separation from whole blood have been transferred and SOPs written. A next stage in Swaziland is scheduled for mid-April 2005 and will be focused on training for investigation of the presence of antibodies against candidate HIV antigens (Tat, Gag, Env and Nef). In South Africa, training for the AI assay has been performed and collection of sera started after approval of local ethical committees. In addition, sera and cells from HIV-infected individuals are being collected to evaluate both humoral and cellular immune cross-recognition of HIV vaccine antigens and HIV diversity. Also these studies have been approved by local ethical committees. Finally, in a pilot experiment, sera from 120 Ugandan individuals (mostly infected by A and D HIV subtypes) with known dates of seroconversion have been used to validate AI assay with non-B HIV subtypes. Preliminary results indicate that the use of AI assay for incidence estimates in Africa, where different HIV subtypes circulate, can be a valid tool.

Conclusions: Besides the results on validation of AI assay for incidence studies, it is expected to provide first results on immune cross-recognition and HIV diversity within the completion of the year from the start of the project, in agreement with the proposed time line.

Grant: 45F/C

BIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF VACCINE FORMULATIONS COMPOSED OF INNOVATIVE NANO/MICROPARTICLES AND HIV-1 TAT (PROTEIN OR DNA)

Arianna Castaldello* (*Università degli Studi di Ferrara*); Rebecca Voltan (*) (*Egidio Brocca Cofano*); Chiara Triulzi (*) (*Luisa Tondelli (CNR)*); Michele Laus** (*Università del Piemonte Orientale, Novara*); Katia Sparnacci (**); Riccardo Gavioli (*) (*Barbara Ensoli (Istituto Superiore di Sanità, Roma)*); Antonella Caputo (*Università degli Studi di Padova*)

Background: The goal is to develop second generation vaccines based on Tat and innovative polymeric delivery systems. We have recently developed and patented innovative, biocompatible, polymeric nanoparticles (50-1000 nm) and microparticles (1-5 micron) able to adsorb biologically active macromolecules (e.g. proteins or DNA) on their surface without the need for added surfactants and/or detergents. These novel particles exhibit a core-shell structure, with an inner core constituted by poly(methylmethacrylate) (PMMA), and a highly hydrophilic outer shell, constituted by hydrosoluble co-polymers bearing ionic or ionisable functional groups (basic or acid EudragitTM, or methacrylic copolymers bearing poly(ethyleneglycol) chains and charged groups), able to reversibly associate with DNA and proteins. The charged macromolecules are not simply adsorbed, but covalently bound to the particle surface, thus avoiding physical desorption and/or instability/toxicity drawbacks associated with vaccine formulations containing free surfactants and/or detergents. The described polymers were chosen based on their biocompatibility (PMMA has been used in surgery for over 50 years; PMMA-based particles have already been shown to be very promising as adjuvants for vaccines and to be slowly biodegradable; Eudragit has been approved for human use). Finally, cationic block copolymers have been developed for the delivery of DNA.

Methods: Mice were immunized by the i.m route with the DNA or protein/particle complexes according to several immunization schedules, and sacrificed 10 days after the last immunization for analysis of humoral and cellular immune responses and for histological and immunohistochemical examination, according to standard procedures.

Results: Microparticles for protein delivery. We have shown that they bind, deliver and release Tat intracellularly *in vitro* and *in vivo*, preserve Tat biological activity, protect it from oxidation increasing the stability of the vaccine formulation, are safe after multiple i.m. injections in mice, elicit anti-Tat humoral (IgG1 and IgG2a) and cellular responses, the best being H1D. Large-scale synthesis of H1D is feasible, easy, reproducible, inexpensive. To start GLP/GMP process development we have shown in preliminary experiment that H1D can be autoclaved without losing their morphology and capacity to bind biologically active Tat. Alternatively, H1D/Tat complexes can be lyophilized, stored at room temperature, and resuspended before use preserve Tat biological activity. Smaller nanoparticles (MA and MC series) for mucosal immunization have been produced and characterized. Nanoparticles for DNA. We have shown that they bind/release plasmid DNA, are safe, and in a prime-boost regimen. Immunization with 1 mg of plasmid DNA/1 mg PEG32 in a prime-boost regimen elicits Ag-specific humoral responses, elicits Ag-specific Th1 and Th2 responses, and CTLs, broadens Ag-specific cellular responses increasing the number of target epitopes as compared to immunization with naked DNA. Also these formulations are stable in a powder form at room temperature.

Conclusions: These results suggest that the described delivery systems could be applied to the development of novel vaccine formulations characterized by increased stability, shelf-life and low costs.

Grant: 45F.5

LENTIVIRAL VECTORS FOR GENE TRANSFER OF SIV/HIV VIRAL PROTEINS FOR IMMUNIZATION IN THE MOUSE MODEL

Viviana Buffa* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Donatella M.R. Negri (*); Pasqualina Leone (*); Roberta Bona (*); Martina Borghi (*); Ilaria Bacigalupo (*); Davide Carlei (*); Cecilia Sgadari (*); Barbara Ensoli (*); Andrea Cara (*)

Background: Genetic immunization using viral vectors provides an effective means to introduce foreign immunogens into the antigen presentation pathway for T cell stimulation. So far, several viral vectors have proven efficacious in inducing immune responses after direct injection *in vivo*. Among these, recombinant self-inactivating lentiviral vectors (LV) are very useful since they are able to efficiently transduce and express foreign genes into a wide variety of mammalian cells in a manner similar to the parental wild type. To this aim we (i) constructed self inactivating LV expressing the full length HIV-1HXB2 Rev/Env, the codon optimized HIV-1JR-FL gp120 and the codon optimized SIVmac239 Gag coding sequences and (ii) evaluated the ability to induce a persistent immune response against the viral proteins expressed by the LV in a preclinical murine model.

Methods: (i) SIV-Gag and HIV-Env genes have been inserted downstream the CMV promoter in the LV to produce the TY2-IIIIBEnv, the TY2-JREnv and the TY2-SIVGag, respectively. For production of the recombinant LV expressing the SIV-Gag and the HIV-Env proteins, LV have been transfected into the 293T packaging cell line along with a vector expressing the VSV.G envelope and the packaging vector DR8.2. (ii) To evaluate the ability of the recombinant LV to express viral proteins, LV expressing HIV-Env and SIV-Gag have been used to transduce *in vitro* macrophages and dendritic cells (DC). For *in vivo* experiments, BALB/c mice were immunized with a single injection of the self-inactivating LV carrying the HIV-Env and the SIV-Gag coding sequences. Antigen-specific immune responses were analysed at 15 days, 1 month and 3 months after vaccination at the humoral (titres IgG) and cellular (CTL responses, detection of gamma-IFN producing cells by ELISpot) levels.

Results: (i) Following 293T transfection, recombinant viruses were able to transduce primary cells such as macrophages and DC. Moreover, transgene expression was efficient and prolonged. (ii) A single immunization of BALB/c mice with the recombinant TY2-IIIIBEnv, TY2-JREnv and TY2-SIVGag was able to elicit long-lasting specific cellular responses as measured by gamma-INF ELISPOT and chromium release assays upon *in vitro* stimulation of splenocytes from BALB/c immunized mice. However, only the TY2-JREnv and the TY2-SIVGag immunized mice were able to elicit specific humoral responses measured as anti-Env and anti-Gag antibody production.

Conclusions: These data provide the first evidence that a single direct administration *in vivo* of a lentiviral vector encoding a viral gene might represent a useful immunotherapeutic strategy and a novel tool to evaluate HIV-1 pathogenesis.

Grant: 45F/C

PRECLINICAL STUDIES ON IMMUNOGENICITY OF THE HIV-1 P17-BASED PEPTIDE AT20-KLH

Arnaldo Caruso* (*Università degli Studi di Brescia*); Elena Marini (*); Simona Fiorentini (*)

Background: Several studies have suggested that HIV-1 p17 plays an important role in AIDS pathogenesis. High levels of p17 antibodies (Abs) correlated with slower progression to AIDS. The finding of a protective role of immunological response to p17 and the presence of neutralizing epitopes on p17 are surprising since p17 is located to the interior surface of the viral membrane. We have shown that p17 is a viral cytokine capable of increasing T cell proliferation and the release of proinflammatory cytokines. p17 also induced an increased rate of HIV-1 replication *in vitro*. All p17 activities were exerted after its binding to a specific cellular receptor. The functional p17 epitope involved in receptor binding was found to be located at the NH₂-terminal region of the viral protein. Aim of our study was to use different doses of a 20aa-long peptide representing the p17 functional region (AT20) or p17 to induce the development of Abs capable of blocking the p17/receptor interaction. A significant association between high frequencies of p17-specific CTL and a slower disease progression has also been described. Therefore, since both cellular and humoral responses seem to be necessary for an effective HIV vaccine protection, we also tested the capability of different antigenic preparations, alone or in combinations, to elicit a p17-specific cell-mediated immunity.

Methods: HIV-1 p17 was produced in a prokaryotic expression system and purified by affinity chromatography followed by reverse-phase HPLC. The p17-based 20 aa-long peptide AT20 (SGGELDRWEKIRLRPGGKKK) has been conjugated with the carrier molecule KLH. Coupling occurred through the Cys residue of AT20 and the primary amino groups of the carrier protein by using Sulfo-SMCC. C57BL/6 mice were immunized with p17 or AT20-KLH at 1, 5 and 25 ug/mouse and boosted i.p. twice at 15-day intervals with the same dose of immunogen. Detection of antibodies was performed by AT20- and p17-based ELISAs. Cell mediated immunity was studied by cell proliferation, flow cytometry and IFN-gamma release.

Results: We have defined the optimal doses of p17 and AT20-KLH necessary for eliciting p17 Abs capable to block p17/receptor interaction. We found that 5 ug of p17 was the minimal dose able to induce neutralizing Abs in all the animal tested. AT20-KLH, at a concentration as low as 1 ug, induced high titers of blocking Abs in 75% of mice. Higher doses of both immunogens only slightly increase the neutralizing capacity of sera. AT20-KLH immunization did not generate a cell-mediated immune response. On the contrary, cell-mediated immunity was consistently shown in mice immunized with p17. In order to redirect Ab production toward the p17 neutralizing epitope and contemporarily activate cell-mediated immunity, we performed immunization experiments in which mice were primed with AT20-KLH and then boosted with p17. Two doses of AT20-KLH (5, 25 ug) and two doses of p17 (5, 25 ug) were tested in all possible combinations. The best performing immunization schedule was priming animals with 5 ug of AT20-KLH and then boosting them with 25 ug/mouse of p17. The combined immunization schedule gave rise to the appearance of anti-AT20 Abs at high titers (from 1/25600 to 1/102400) together with the induction of a significant p17-specific T cell proliferation and CD8⁺ T cell expansion.

Conclusions: Our results show that AT20-KLH is capable of inducing p17 neutralizing Abs in a prime-boost regimen. Furthermore, we show that it is possible to skew the humoral response induced by priming mice with the peptide-based vaccine toward cell-mediated immune responses, boosting animals with p17.

Grant: 45F.6

PROTECTIVE IMMUNITY INDUCED IN MICE PRIMED BY VAGINAL ROUTE WITH INFLUENZA A VIRUS

Bruno Garulli (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Monica Meola* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Maria Giuseppina Stillitano (*); Maria Rita Castrucci (*)

Background: The induction, long-term maintenance and recall of memory T-cell populations are essential to consider for the development of vaccination strategies capable of preventing the transmission or limiting the severity of pathogens. We recently showed that vaginal (vag.) immunization of BALB/c mice with a recombinant influenza virus bearing an HIV-1 epitope induced mucosal and systemic long-lasting memory CTLs specific for the foreign epitope, as detected by rapid recall of effector CTLs upon re-exposure to the antigen. To evaluate the extent to which such memory responses afford protection from challenge with pathogens, we determined the efficacy of the immune response induced upon vag. immunization with influenza virus on viral clearance and survival in the context of the murine model of influenza virus infection. By taking into account the immunological cross-talk within the mucosal compartments, we also compared the efficacy of the vag. route of immunization versus the intranasal (i.n.) route in the induction and tissue distribution of memory T cell populations.

Methods: Groups of BALB/c mice were either vag. or i.n. primed with X31 (H3N2) and four months later i.n. infected with WSN (H1N1) virus that shares the NP147 immunodominant epitope (H-2Kd) with the X31 virus. On day 3 or day 5 after secondary infection, the inflammatory cells collected from the lung airways were directly tested in intracellular IFN-g or subjected to tetramer staining. Splenocytes and mediastinal lymph nodes were cultured and examined for CTL activity or assayed for intracellular IFN-g staining. The antibody response to the priming virus was tested by ELISA three months after the mice were either vag. or i.n. infected with X31 virus. For the homologous lethal challenge, mice were either vag. or i.n. primed and three months later i.n. challenged with 100 MLD50 of the same WSN virus. For the heterologous lethal challenge, mice were immunized with X31 virus by the vag. or i.n. route and three months later, they were i.n. challenged with 10 MLD50 or 20 MLD50 of WSN virus.

Results: In this study, we demonstrated that vag. immunization of BALB/c mice can induce long-lasting memory T-cell populations that can be efficiently recruited and maintained in the respiratory tract following an i.n. challenge. At early times after challenge, we found that higher levels of subtype cross-reactive CD8⁺ T lymphocytes were detected in lung airways and lymphoid tissues draining the respiratory tract of vag. than i.n. primed mice. By contrast, lower levels of specific antibody responses were found in mice vag. primed, suggesting a fine tuning of antibody and cell mediated responses. A complete protection against challenge in genital tissues and i.n. infection with 10 MLD50 doses of WSN virus was observed in either vag. or i.n. primed mice. However, the lower levels of cross-reactive antibodies in association with the lack of memory CD8⁺ T cells in the lung airways of vag. primed mice, before the i.n. challenge, may account for the reduced protection observed against the 20 MLD50 dose of WSN virus. Experiments are in progress to further investigate the role as well as distribution and maintenance of these effectors in the genital tissues and draining lymphoid organs.

Conclusions: We show a significant protection against influenza virus challenge achieved upon vag. priming in either local genital or distal respiratory mucosa. The data support the useful role of the murine model of influenza virus to dissect the immunogenic features associated with vag. immunization as well as the ability of influenza virus as a vector of HIV-1 antigens.

Grant: 45F/A

ALPHA-DEFENSINS IN THE PREVENTION OF HIV TRANSMISSION AMONG BREASTFED INFANTS

Daria Trabattoni* (*Università degli Studi di Milano*); Louise Kuhn (*Columbia University, NYC, NY, USA*); Chipepo Kankasa (*University of Lusaka, Lusaka, Zambia*); Francesca Lissoni (*); Grace Aldovrandi (*USC, Los Angeles, CA, USA*); Mario Clerici (*)

Background: Even in the absence of therapy, the majority of infants of HIV-infected mothers do not become infected. Maternal viral load and immune status contribute to the rate of mother-to-child HIV transmission, but other, as yet poorly-defined factors, including HIV-specific T lymphocytes, IgA, and antiviral soluble factors, may be involved in determining whether perinatal and postnatal exposure to HIV will result in infection. Alpha-defensins have been observed to have anti-HIV activity but have not been investigated in relation to mother-to-child HIV transmission. We measured the concentration of alpha-defensins in breast milk of HIV-positive mothers and tested whether the concentrations were associated with HIV transmission.

Methods: A nested case-control study of 32 HIV-positive women who transmitted and 52 randomly-selected HIV-positive women who did not transmit HIV to their infants was conducted in Lusaka, Zambia. HIV-positive women with HIV-infected infants (n=32) were selected as transmitting cases. A child with a confirmed positive HIV DNA PCR test at 4 months or earlier was defined as HIV-infected. The cases were further stratified into (i) those who were presumed to have acquired HIV infection intrauterine because they had a positive PCR on their sample collected on the day of birth (n=9) at birth or (ii) those who were presumed to have acquired HIV infection intrapartum or postpartum because they had a negative PCR at birth but a positive PCR at one week or later (n=23). For comparison, non-transmitting controls (n=52) were randomly selected from among HIV-positive women with uninfected infants. A child with a negative PCR test at 4 months or older and no positive PCR tests was defined as uninfected. Breast milk concentration of alpha-defensins was assayed by commercially available ELISA. Defensins were measured after the milk samples had been centrifuged at 25000 RCF 12500 rpm 30' at 4°C to remove the pellet and lipid layer. The supernatants were diluted 1:5000 in sterile saline solution or in PBS just before use.

Results: Alpha-defensins were detected in the majority (79%) of milk samples tested. Concentrations of alpha defensins increased as breast milk HIV RNA quantity increased, and breast milk HIV RNA quantity was, in turn, a strong and significant predictor of HIV transmission. After adjustment for milk HIV RNA quantity, however, alpha-defensin concentration was significantly associated with decreased risk of intrapartum and postnatal HIV transmission (odds ratio = 0.3; 95% CI: 0.09 – 0.93).

Conclusions: Our data suggest that there may be a role for alpha-defensins in prevention of HIV transmission to breastfed infants.

Grant: 45F.7

QUANTITATIVE ANALYSIS OF HUMAN HERPESVIRUS 8 VIRAL LOAD USING A REAL TIME PCR ASSAY

Paola Cordiali Fei* (*IRCCS San Gallicano, Roma*); Elisabetta Trento (*); Emanuela Simonetti (*Bioaesis S.r.l.*); Antonella Vento (*); Valentina Bordignon (*); Giovanna D'Agosto (*); Fabrizio Ensoli (*)

Background: The prevalence of HHV-8 infection is higher in HIV infected subjects than in the HIV-negative individuals in the same geographical area. An accurate evaluation of HHV8 infection in both HIV-negative and HIV-infected volunteers requires precise determinations of the plasmatic viral load as marker of active viral replication. This represents an important issue in the setting HIV vaccine clinical trials, for both pre-screening and monitoring of vaccinees and requires the validation and standardization of the operating procedures to ensure precise and comparable read-outs in a multicentric context.

Methods: The aim of this work was to develop Standard Operating Procedures (SOPs) for HHV-8 quantification by a Real Time PCR technique in plasma of both HIV-negative and HIV-infected subjects. The approach is based on Taq Man technology: primer pairs and oligonucleotide probe are labelled with the reporter 6-FAM at the 5' end and with a rhodamine dye (TAMRA) quencher linked to the 3' end. Primers and probes have been designed to amplify and detect a 74-bp amplicon in the HHV-8 minor capsid protein gene (ORF 26) by a real time PCR assay (Bio Rad iCycler iQ). A standard curve has been generated by using serial dilution of a previously titrated HHV-8 viral particles preparation (DNA ABI, 1.9×10^4 copy number). Calibrators were introduced to assess the linearity, precision and sensitivity of the assay. The specificity of the real time PCR for HHV-8 DNA detection has been preliminarily estimated on plasma samples from subjects with or without HHV-8 infection as determined by the serological assay based on BCL-1 infected cells.

Results: The linear dynamic range of the assay was 9.5 to 1.9×10^4 copies ($r^2 > 0.99$). The viral load in plasma of patients with anti-HHV-8 positive determinations (10 pts with Kaposi's sarcoma, 10 patients with concomitant HIV/HHV-8 infections) and in patients HHV-8 serologically negative (10 patients with psoriasis, 5 patients HIV+) was analyzed. HHV-8 viral load was correlated with lytic antigen positive/negative serology.

Conclusions: Preliminary results suggest that the procedure based on real-time PCR represents a reproducible and sensitive technique for HHV-8 viral load quantification which may prove a useful tool for both pre-screening and monitoring of vaccinees in the setting HIV vaccine clinical trials.

Grant: 45F.8

VIROLOGICAL CHARACTERIZATION OF HIV-1 GENOME FOR PREVENTIVE AND THERAPEUTIC CLINICAL TRIALS IN HIV-POSITIVE SUBJECTS FOR VACCINE DEVELOPMENT

Roberta D'Arrigo* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Caterina Gori (*); Maria Concetta Bellocchi (*); Federica Forbici (*); Fabio Continenza (*); Daniele Pizzi (*); Francesca Ceccherini Silberstein** (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Ada Bertoli (**); Carlo Federico Perno (*)

Background: Virological studies regarding the HIV-1 infection in seropositive individuals enrolled in selected cohorts are a fundamental support for the improvement of the efficacy both preventive and therapeutical vaccines development and for selection and improvement of vaccine candidates. Through the characterization of a great number of HIV-1 genome sequences in a seropositive cohort it is in fact possible to investigate the variable and invariable regions of HIV, to identify structural or regulatory genes as good future candidates for development of an anti-HIV-1 vaccine, and to evaluate the virus genetic evolution in infected-patients undergoing therapeutic vaccine.

Methods: HIV-1 genome analysis has been achieved by the development and the optimization of molecular biology techniques; the full HIV-1 genome sequencing has been performed by viral RNA extraction from plasma samples, six home-made RT-PCR (home-made Nested PCR if necessary) and sequencing of PCR fragments. The HIV-1 nucleotide and aminoacidic sequences have been analysed by a commercial advanced sequencing software (seqscape v.2, AB) and a HIV-1 consensus sequence has been generated; in addition, a phylogenetic analysis has been performed by using of Phylip software package (v. 3.63).

Results: Optimized molecular biology techniques and primers to amplify and to sequence HIV-1 genome showed positive results in 95% of the analysed samples, and in addition by using nested-PCR technique HIV-1 samples with HIV-RNA under 1000 cp/ml have been sequenced in the majority of analysed subjects. Preliminary studies have been performed first in 150 HIV-1 infected samples (classified as B and non-B clades) and the obtained data have been included in a database that will provide a fundamental support both for the selection of conserved HIV genome areas involved in the vaccine development and for the monitoring of the efficacy of the therapeutic vaccine trial.

Conclusions: Analysis of the HIV-1 dynamic and evolution of viral genome sequences in a great number of seropositive individuals and the construction of a database for the management of generated data, represents a fundamental support for the improvement of the efficacy both preventive and therapeutical vaccines development and for the evaluation, through phylogenetic analysis, of the different distribution of HIV clades and viral circulating recombinant forms (CRFs) in different geographic regions. The construction of the database including HIV sequences will help to analyze the genome areas corresponding to the selected vaccine epitopes and to study the evolution of the disease before and after preventive clinical trials.

Grant: 45F.9

PREPARATORY STUDIES (LABORATORY AND CLINICAL SETTING) FOR PREVENTIVE AND THERAPEUTIC CLINICAL TRIALS IN ADULTS

Gianpiero D'Offizi* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Chrysoula Vlassi (*); Rita Bellagamba (*); Valerio Tozzi (*); Lino Narciso (*); Angela Corpolongo (*); Paola Scognamiglio (*); Pietro Balestra (*)

Background: Therapeutic vaccination against human immunodeficiency virus (HIV-1) infection is considered a novel treatment strategy for chronically infected patients. The aim is to educate patients' immune system and evaluate one more potent and effective response against virus of HIV. Up to this time no therapeutic vaccine was proved as useful and effective for treatment of HIV-infected individuals. A vaccine of this kind could have an enormous clinical and social impact; it could permit longer periods without antiretroviral therapy, with less collateral effects for the patient and lower social cost. Moreover, it could be administered to naïve patients with acute or chronic HIV-infection to prevent disease progression and to prolong time until initiation of antiretroviral therapy. Furthermore, the therapeutic vaccine could be administered in conjunction with antiretroviral therapy to patient showing an effective and stable suppression of viral replication but a poor immune-reconstitution (discordant viro-immunological response), or in patients during structured therapy interruption to enhance specific immune response and retard disease progression.

Methods: To select an Italian multicentric cohort of HIV volunteers for the clinical testing of therapeutic vaccine candidates in phase I/II studies according to different clinical scenarios: HIV+ asymptomatic patients naïve for antiretroviral therapy (CDC A) with CD4+>350 cells/mm³ and HIV-RNA<50.000 copies. Patients with documented primary HIV infection will be enrolled 6 months after seroconversion. HIV+ treated patients with stable and effective control of HIV replication but a poor immune-recovery (CD4+<350 cells/mm³ and HIV-RNA<50 copies). HIV+ patients who started therapy during primary HIV infection, then undergoing to structured therapy interruption (CD4+>350 cells/mm³ and HIV-RNA<50.000 copies). HIV+ patients who started therapy during chronic phase of HIV infection, then undergoing to structured therapy interruption (CD4+ >350 cells/mm³ and HIV-RNA<50.000 copies).

Results: The project was started a few months ago. The expected results are: Creation of a centralized database (within month 6). Establishment of the Italian Cohort of HIV patients, to be enrolled in treatment (vaccine and/or antiretroviral drugs) clinical months (within month 12). Decision of the number of patients to be enrolled in the designed cohorts. Establishment of an Italian multicentric cohort.

Conclusions: It will be possible: To define a large cohort of HIV infected patients potentially willing to be recruited in therapeutic vaccine trials (phase I/II) in Italy. To define the reliability and efficacy of therapeutic vaccine among HIV-1 infected persons.

Grant: 45F.15

DEVELOPMENT AND COMBINED UTILIZATION OF RECOMBINANT DNA, AVIPOX VECTORS AND VIRUS-LIKE PARTICLES FOR PRECLINICAL EVALUATION OF PREVENTIVE OR THERAPEUTIC EFFICACY IN SHIV-MACAQUE MODEL OF AIDS

Carlo De Giuli Morghen* (*Università degli Studi di Milano*); Manuela Paganini (*); Valeria Basavecchia (*); Veronica Elli (*); Carlo Zanotto (*); Antonia Radaelli (*)

Background: A complete humoral and cellular immune response is considered to be necessary in both preventive and therapeutic vaccines. The spread of AIDS is mainly due to sexual intercourse through the transmission of macrophagotropic or dualtropic genetic variants of HIV utilizing preferentially the CCR5 coreceptor. It appears therefore evident the need to develop immunogens able to induce high levels of neutralizing antibodies as well as the CCR5 natural ligands RANTES, MIP-1 alfa and MIP-1 beta. Our recently published results suggest that a therapeutic immunization can be a useful approach to restore the cell-mediated immunity in SIV-infected animals in which viremia was successfully contained by ART and may also represent an indication of a possible immunoprophylactic intervention in healthy, high risk, subjects. Starting from these promising results we intend to increase the efficacy of the DNA and FP vaccines by: 1. broadening the expression and immunogenicity of the constructs by inserting other immunologically relevant HIV regulatory and accessory genes as well as costimulatory molecules into DNA expression plasmids and newly identified non-essential regions of FP genetic patrimony; 2. prepare chimeric virus-like particles by coinfection of monkey cells with the two FPgag/pol and FPenv recombinants expressing separately SIVgag/pol and HIVenv genes; 3. determine the innocuity and compare the immunogenicity of these new formulations with the ones already tested in mice.

Methods: To determine the complete immune response to three different anti-HIV/SHIV immunization regimens in mice, the only small animal species allowing the determination also of CTL response, we performed a series of experiments to evaluate the following parameters:- anti-gag/pol and anti-env antibody titer (by ELISA) - SHIV89.6P neutralizing titer (using CEM-GFP as target cells and flow cytometry analysis)- lymphoproliferative CD4⁺ response (after stimulation with p27 and/or gp120 peptides)- Th1 (IFN- γ and IL-2) and/or Th2 (IL-4 and IL-10) cytokine profile (by real time RT-PCR) - quantitation of gag-specific CTLs (by tetramer staining) - CD4/CD8 ratio (by flow cytometry analysis after labelling with antiCD4 and antiCD8 antibodies)

Results: The cellular and humoral responses to the different protocols (see the scheme in the original project) were determined by Elispot and ELISA assays at one week intervals. Statistically significant cellular responses were observed with gp120 but not with p27. This was expectable because gp120 is immunogenic in Balb/c mice but not p27, which is immunogenic only in C3H strain. In particular, the most responsive group of mice was the one that received DNA and Fowlpox recombinants, followed by VLPs.

Conclusions: These results, although not definitive, are encouraging since they demonstrate that CD4⁺ and CD8⁺ cellular responses are elicited by a combined utilization of DNA and Fowlpox vectors (encoding gag/pol/env structural antigens) followed by VLPs boosts. Next year, the immunogens will be improved by inserting Tat, Nef and Rev regulatory genes to obtain a broader panel of antibodies able to control viral replication. The challenge of the vaccinated mice with syngeneic B77 tumour cell line, stably transfected with pcDNA3env, will provide new insight into the functionality of the subpopulation of env-specific CTL.

Grant: 45F.10

EARLY THERAPY IN VERTICALLY HIV-1 INFECTED CHILDREN: IMPACT ON THE VIRAL INFECTION AND HIV-1 SPECIFIC IMMUNE RESPONSES

Marisa Zanchetta* (*Dip. di Scienze Oncologiche e Chirurgiche, Università degli Studi di Padova*); Nicoletta Burighel (*); Domenico Bellanova (*); Carlo Giaquinto (*Dip. di Pediatria, Università degli Studi di Padova*); Anita De Rossi (*)

Background: Without antiretroviral therapy, about one third of HIV-1 vertically infected children will develop early AIDS, while the remainder progresses more slowly to disease. The pattern of HIV-1 replication during the first months of life is consistent with that of a primary infection and plays a central role in disease outcome. Treatment of children and adults with highly active antiretroviral therapy (HAART) during chronic infection efficiently reduces the plasma HIV-1 RNA to undetectable levels, but does not eradicate infection. In this study, the effects of early treatment with HAART on the course of infection were evaluated.

Methods: Six HIV-1 infected infants were enrolled; all began HAART within 90 days of age. Median follow-up time was 51 months (range 25-73 months). Sequentially collected samples of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were employed to evaluate plasma HIV-1 RNA, HIV-1 specific antibodies, cell-associated viral parameters (HIV-1 DNA, unspliced (US) and multiply-spliced (MS) HIV-1 mRNAs), CD4 and CD8 cell subsets, and thymic output by TREC measurements.

Results: All children showed a reduction of plasma HIV-1 RNA to undetectable levels in a median time of 7 months (range 5-10 months). HIV-1 DNA persisted in 4 children, who also showed 2-4 blips of plasma HIV-1 RNA (all below 1,000 HIV-RNA copies/ml). Interestingly, only 2 of them had detectable US and MS HIV-1 mRNA, suggesting the presence of an ongoing viral replication in the peripheral compartment. Two children remained consistently negative for all HIV-1 parameters. Thymic output remained fairly constant over time, and CD4 values remained above 25%. None of the children developed AIDS-related symptoms. Only 2 children produced autochthonous antibodies to HIV-1, while the others, having lost the maternal antibodies, remained persistently seronegative. Lack of HIV-1 specific immunity was confirmed by ELISPOT and *in vitro* antibody production assays. HAART was interrupted in two children, one positive for cell-associated HIV-1 DNA, HIV-1 mRNAs and HIV-1 specific antibodies, and one negative for HIV-1 specific immunity and with persistently undetectable levels of any plasma and cell-associated viral parameters. The second one had a more rapid and high rebound of plasmaviremia after HAART discontinuation than the former child; this rebound preceded a productive infection in PBMC and was followed by the onset of specific HIV-1 antibodies within 30 days.

Conclusions: Early treatment with HAART modified the natural course of primary infection in infants by controlling HIV-1 replication, and by reducing to below threshold levels the viral load required for the onset of a HIV-1 immune response. Nonetheless, early HAART does not appear to prevent the establishment of a reservoir of latently infected cells. HAART interruption in these children should be considered with caution and hopefully will be associated with therapeutic vaccination.

Grant: 45F.13

EVALUATION OF EFFICACY OF TAT VACCINE IN LONG TERM NON PROGRESSOR, CHRONICALLY HIV-INFECTED AND EXPOSED UNINFECTED

G. Sergio Del Giacco* (*Policlinico Universitario di Cagliari*); Paolo Emilio Manconi (*)

Background: Tat protein plays a critical role in various phases of HIV infection. Due to its relatively low variability, the protein could furnish a good way for an active immunization against HIV, as both immuno-prophylaxis and immuno-therapy. The work of our group in the last year was aimed to the definition of patients on which the active immunization by means of TAT could be tested. The group of HIV-infected patients followed up in our department consists of 470 HAART-treated and of about 300 untreated individuals. The protecting power of the active immunization by means of TAT must be proved, besides a possible usefulness in HIV-infected patients. Active immune answer against this regulating and trans-activating protein would have a large usefulness in patients with HIV-infection, and this would be an important aspect because of the limited effectiveness along long periods of time of HAART and because of the collaterals effects in the long term (some of which are not well-known or not very defined). In our lab, we collected serum samples from every patient before and each year during anti-viral therapy. From several patients also cell samples have been collect in liquid nitrogen. So, it could be possible to correlate the results obtained during le vaccination with previous immunological and virological parameters. Criteria for the evaluation of individuals on which TAT immunization could be tested have been previously studied by our group.

Methods: Based on the above considerations, we have characterized four cohorts of patients on which active TAT immunization of could be evaluated: a) Patients with good Viro –immunological values (CD4>500, HIV-RNA<400)

b) Patients with CD4 between 200 and 500 and low viraemia

c) Patients with viro-immunological dissociation

d) Patients not undergoing antiviral therapy, with good viral and immunological parameters. Each cohort will include approximately 10 patients which, beyond to the analyses contained in the experimental protocol, would undergo other collateral studies. In particular, blood concentration and the activity *in vitro* of cells NK could constitute an interesting marker to be correlated with the results obtained with the immunotherapy.

Conclusions: Eventual criteria of exclusion in the selection of patients derive from the studies of safety, above all about the hypothetical actions in trans of the protein. It would be opportune to exclude from the selection, all the patients HHV8 co-infected, for the possible relation with the development of Kaposi sarcoma.

Grant: 45F.11

SELECTION CRITERIA AND CHARACTERISTICS OF MULTIPLY EXPOSED UNINFECTED INDIVIDUALS (MEU) AND OF HAART EXPOSED HIV PATIENTS FOR STUDIES AIMED AT IDENTIFYING CORRELATES OF PROTECTION AGAINST HIV-1

Aldo Di Carlo* (*IRCCS S. Gallicano, Roma*); Guido Palamara (*); Fabrizio Ensoli (*); Massimo Giuliani (*); Antonella Tripiciano (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Francesca Stivali (*); Angela Arancio (*); Alessandra Latini (*); Giampaolo Impara (*); Antonio Maini (*)

Background: Patients with syphilis and gonorrhoea represent a population at high risk for acquiring HIV-1 infection by sexual intercourse. Most of them, despite recurrent exposures to other sexually transmitted infections (STI) and a history of behavioural markers of risk (i.e., high number of partners, inconsistent condom use, occasional sex, etc.) remain negative to repeated HIV testing. These individuals defined as “Multiply Exposed Uninfected (MEU)” represent the target population for studies aimed at identifying correlates of spontaneous protection against HIV-1. Similarly, HIV-infected individuals, at different stage of the disease (and naive or already exposed to HAART), represent a valuable population for exploring correlates of protection against disease progression.

Methods: By reviewing the electronic records of all attendees at the HIV Testing Programme of the HIV/AIDS Centre of the San Gallicano Institute, Rome from April 1984 to June 2004, we selected individuals with at least four HIV negative tests and with at least one episode of early syphilis or gonorrhoea between the first and the last HIV test. We also selected, based on medical records, HIV-infected patients at the same Institute, who were at different stages of the disease and with high level of adherence to clinical and therapeutic follow-up. For the HIV-infected and -uninfected individuals, frozen serum samples were taken from the biological repository for the immunological and virological evaluations.

Results: Of the 2,788 HIV-negative individuals tested more than once, 99 were identify as MEU. Of these, 97 (98.0%) were males. The median age was 45 years (range 23-77), and 66 (66.7%) were men who have sex with men (MSM), 27 (27.3%) non drug-using heterosexuals and 6 (6.1%) partners of HIV-positive individuals. The median number tests per individual was 7 (range 4-56), with no significant differences among the three groups. The median period of follow-up was 9 years (range 1-19) for MSM, 9 years for non drug-using heterosexuals, and 13.5 years (range 4-16) for partners at risk. Among the 99 MEU, 64 (64.6%) had had one diagnosis of infectious syphilis; 7 (7.0%) had two diagnoses and 1 (1.0%) three diagnoses. Of the 26 patients without a history of syphilis, 25 (25/99, 25.2%) had had gonorrhoea once and 1 (1%) had had it twice. The distribution of syphilis and gonorrhoea diagnoses among the MEU individuals by exposure category, is shown in the table. Of the 205 HIV patients currently followed in the HIV care Unit of the Institute, 74 with complete follow-up visit were selected. Of these 58 were males (78.4%) and 51 (68.9%) MSM. Exposure category N. Syphilis Gonorrhoea N(%) N(%) MSM6649 (74,2) 36 (54,5) Heterosexuals 2721 (77,8) 21 (77,8) Partner at risk 62 (33,3) 5 (83,3%).

Conclusions: The availability of frozen biological samples and complete clinical and behavioural data on HIV-complained patients and person defined as MEU, allowed us to select two cohort of individuals can be studied to evaluate (also longitudinally) potential correlates of protection of HIV-1.

Grant: 45F.14

EVALUATION IN CYNOMOLGUS MONKEYS OF THE SAFETY, IMMUNOGENICITY AND EFFICACY OF NOVEL VACCINE CANDIDATES COMBINING HIV/SIV ENV, GAG AND TAT ANTIGENS ADMINISTERED IN PRIME-BOOST REGIMENS AS EITHER PLASMID DNA, OR RECOMBINANT ADENOVIRAL VECTORS FOR PRIMING, AND THE CORRESPONDING RECOMBINANT PROTEINS AS BOOST, TO INDUCE SYSTEMIC AND MUCOSAL IMMUNITY

Aurelio Cafaro* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Silvia Baroncelli (*); Roberto Belli (*); Zuleika Michelini (*); Maria Teresa Maggiorella (*); Donatella M.R. Negri (*); Maria Rosaria Pavone Cossut (*); Stefania Farcomeni (*); Piergiorgio Pupino Carbonelli (*); Leonardo Sernicola (*); Elio Iale (*); Marco Azzetti (*); Maurizio Chiodi (*); Fabio Incitti (*); Fausto Titti (*); Barbara Ensoli (*)

Background: Recently preclinical and clinical evaluation have demonstrated that vaccine based on HIV-1 regulatory proteins Tat, Rev and Nef, which are expressed early upon infection, exert key functions in infection and are highly conserved among the HIV clades, are safe in humans and capable of controlling virus infection in monkeys (Mks). Scope of this project was to investigate whether the association of regulatory (Tat) and structural (Env, Gag) gene products was safe, immunogenic and superior to vaccination with the single antigen (Ag) with respect to protection from infection or disease progression. Also, novel delivery systems (microparticles and adenoviral vectors) have been evaluated and compared to protein or DNA prime - protein boost strategies.

Methods: A comprehensive evaluation of humoral and cellular immunity is being carried out prior to and during vaccination, including clinical monitoring, laboratory testing for standard blood chemistry and evaluation of specific immune responses [cellular phenotype by FACS analysis, T-cell responses (Ag-driven proliferation, production of gIFN/IL-4 by ELISpot and/or intra-cellular staining, Ag-specific CTL), B cell responses (Ag-specific IgG titers and, where applicable, neutralizing activity and mucosal IgG and IgA)].

Results: the following vaccine candidates are evaluated and compared in cynomolgus and/or rhesus MKs: HIV-1 Tat protein administered either subcutaneous (SC) with alum or intramuscularly (IM) upon conjugation to microspheres (H1D-Tat). Results from this study indicate that H1D-Tat is safe, primes for both humoral and cellular immune responses that become readily detectable after a Tat + alum boost (SC), and confers control of infection upon challenge with 15 MID50 of the pathogenic SHIV89.6P. (Cooperation with ICAV) HIV-1 Tat protein administered both SC with Alum, and intradermally (ID) with no adjuvant or with a recombinant replicating human adenoviral vector (Ad5hr) expressing HIV-1 Tatwt (Ad5hr-tat) administered intranasally (IN) and 12 weeks later intratracheally (IT). (Cooperation with NIH) HIV-1 Tat ± HIV-1 Env ± SIV Gag. Four groups of MKs have been immunized with i) HIV-1 Tat protein administered SC with Alum and ID without Alum, followed by an Iscoms boost; ii) Ad5hr-tat; iii) Ad5hr-tat + Ad5hr-env; iv) Ad5hr-tat + Ad5hr-env + Ad5hr-gag + Ad5hr-nef. All the Ad5hr vectors were administered IN and 12 weeks later IT. (Cooperation with NIH). HIV-1 Tat and HIV-1 Env (V2-deleted, DV2 Env) proteins, administered SC with Alum. MKs were immunized twice with HIV-1 Tat and twice with Tat and DV2 Env proteins combined. Preliminary results indicate that co-immunization with Tat and DV2 Env is safe and immunogenic. (Cooperation with ICAV, AVIP).

Conclusions: Overall, these studies indicate that i) the novel delivery systems are suitable for vaccination against Tat alone or associated to other antigens, and that ii) vaccine strategies combining regulatory and structural HIV-1/SIV gene products are safe and immunogenic in MKs. Challenge with the pathogenic SHIV89.6P will be performed to assess the efficacy.

Grant: 45F/C

IMMUNOLOGICAL AND VIROLOGICAL BACKGROUND STUDIES ACCORDING TO THE SPECIFIC VACCINE CANDIDATE TO BE TESTED IN PHASE I/II CLINICAL TRIALS

Fabrizio Ensoli* (*IRCCS S. Gallicano, Roma*); Valeria Fiorelli** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Antonella Tripiciano (**); Arianna Scoglio (**); Barbara Collacchi (**); Maria Jose Ruiz Alvarez (**); Concetta Giannetto (**); Antonella Fazio (**); Giovanni Paniccia (**); Angela Arancio (*); Francesca Stivali (*); Vittorio Francavilla (**); Olimpia Longo (**); Guido Palamara (*); Ivano Mezzaroma*** (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Aldo Di Carlo (*); Fernando Aiuti (**); Barbara Ensoli (**)

Background: Key issues in vaccine development include a detailed analysis of the immune response to the candidate antigen(s) during the natural course of infection as well as knowledge of the impact that HAART might have on antigen-specific functions. In addition, testing in vaccinated volunteers requires the validation, standardization and preparation of Standard Operating Procedures (SOPs) for both humoral and cellular immune assessment. We have performed a comparative evaluation of specific humoral immune response against distinct HIV-1 regulatory (Tat) and structural (Env) antigens in HIV-infected patients, prior to initiation and during HAART, and in seronegative volunteers at low risk for infection.

Methods: An algorithm based on two highly specific ELISA assays which utilize a purified native Tat protein derived from the HIV-1 clade B strain (HTLV-III_B, clone BH-10) was used to determine the presence of anti-Tat humoral immunity in 84 HIV-infected patients and in seronegative volunteers. Specific testing has been validated and performed following SOPs developed for the assessment of anti-Tat humoral immunity (detection and titration of specific IgG, IgA and IgM; B-cell epitope mapping). Routine immunologic (CD4 T cells) and virologic (plasma viral load; VL) determinations were performed every 3/4 months.

Results: Humoral immune assessment before HAART indicated a higher prevalence of anti-Tat antibodies in asymptomatic (stage A) individuals as compared to patients at B and C stages. B-cell epitope mapping revealed the presence of linear epitope-specific IgG in 45.4% of the anti-Tat positive sera and confirmed a major immunodominant B cell epitope at residues 1-20. However, the largest portion of the humoral response against Tat was directed toward conformational epitopes. Remarkably, the presence of anti-Tat antibodies was associated with significantly lower levels of VL before HAART ($p < 0.001$). In addition, determination of VL during HAART indicated that anti-Tat immune responders had a more effective virological response. This is indicated by the kinetic of VL which shows a more pronounced curve of inhibition of virus replication in anti-Tat immune responders after HAART initiation. Analysis of the anti-Tat response during therapy, however, revealed a statistically significant decrease of the production of anti-Tat IgG, but not of antibodies against the HIV-1 gp120, in all individuals. Whether this may reflect the reduced antigenic load during HAART or direct interference of PI with the development and/or maintenance of specific cellular and humoral immune responses is, as yet, unknown.

Conclusions: These data indicate that the presence of Tat-specific antibodies is associated with lower levels of virus replication and with a stronger efficacy of antiretroviral therapy. These results support the notion that anti-Tat immunity represents a strong immune correlate of protection against disease progression and suggest that maintaining or boosting a specific anti-Tat immune response during HAART may contribute to an increased effectiveness of the antiretroviral regimen.

Grant: 45F.16

HIV-1 TAT TARGETING AND ENTRY INTO MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS

Emanuele Fanales Belasio* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Sonia Moretti (*); Maria Rosaria Pavone Cossut (*); Iole Macchia (*); Giovanni Barillari (*); Aurelio Cafaro (*); Barbara Ensoli (*)

Background: The HIV-1 protein Tat is produced in the early phase of virus infection and, together with the other regulatory protein Nef and Rev, has a key role in promoting viral gene expression and replication. Of note, Tat is released by HIV-1 infected cells and has been shown to interact with cells of the immune system, particularly dendritic cells, key to the induction of antiviral immunity. We have reported that soluble Tat efficiently enters monocyte-derived dendritic cells (MDDC), promoting their maturation and function (Fanales-Belasio *et al.* *J. Immunol.* 2002). The mechanisms and molecules underlying this property, however, are still to be characterised. In the last years plasmacytoid-derived dendritic cells (PDDC) have been characterised, but their role in the immune response against HIV-1 has to be further studied. Thus, the interaction of Tat and other regulatory proteins with both MDDC and PDDC needs to be evaluated, in relation to the induction of protective immune responses.

Methods: Cultures of MDDC have been established based on previous studies. Specifically, monocytes from peripheral blood have been purified by use of anti-CD14 coated beads and magnetic sorting, cultured in the presence of the cytokines GM-CSF and IL-4 and differentiation into MDDC evaluated by light microscopy and flow cytometry. The setting of cultures of PDDC, derived from BDCA-2+ peripheral blood precursors, has been started with methods based on antibody-coated beads and magnetic sorting. CD1a+ MDDC have been cultured in the presence of Tat and the entry of the protein has been evaluated by intracellular staining with a specific polyclonal antibody. Tat uptake by other blood derived cell populations as T and B lymphocytes, natural killer cells, monocytes and monocyte-derived macrophages (MDM) has been performed in comparison to MDDC. In order to characterise the surface molecules involved in the process, preliminary experiments with the blocking of alpha-5 beta-1, alpha-v beta-3 and alpha-v beta-5 integrins by specific antibodies or their natural ligands Fibronectin (FN) and Vitronectin (VN) before the addition of Tat to MDDC have been performed.

Results: Cultures of CD1a+ MDDC have been established with a suitable degree of differentiation and purity. Cultures of PDDC are partially established (low degree of purification), and further setting of the methodology is necessary for the experiments with Tat protein. As already published, MDDC take up Tat up to picomolar doses and this process is energy-dependent and requires a conserved protein conformation, suggesting Tat targeting to MDDC surface receptors. The comparison with other blood-derived cell populations showed that only MDM take up Tat at any dose, although less efficiently than MDDC, while Tat uptake by monocytes was observed only at micromolar doses. Tat uptake by other blood-derived cells resulted very poor or absent. Data from preliminary experiments with MDDC showed that the blocking of alpha-5 beta-1, alpha-v beta-3 and alpha-v beta-5 integrins by specific antibodies or FN and VN markedly reduced the uptake of Tat at any dose, abolishing it at the lowest ones.

Conclusions: The uptake of Tat is selective with the monocyte-derived cell lineage, mostly efficient with MDDC, while it is not observed with lymphocyte subsets. Tat uptake by MDDC is energy-dependent and preliminary data suggest the involvement of alpha-5 beta-1, alpha-v beta-3 and alpha-v beta-5 integrins. Further studies are required to characterize the domains of the protein and the surface molecules involved in this process.

Grant: 45F/C

A NOVEL HIV VACCINE BASED ON THE COMBINATION OF HIV TAT AND ENV PROTEINS

Flavia Ferrantelli* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Zuleika Michelini (*); Iole Macchia (*); Paolo Monini (*); Alessandra Borsetti (*); Filomena Nappi (*); Aurelio Cafaro (*); Fausto Titti (*); Antonella Caputo (*Università degli Studi di Padova*); Riccardo Gavioli (*Università degli Studi di Ferrara*); Susan Barnett (*Chiron Corporation*); Barbara Ensoli (*)

Background: To date, much of the effort in HIV vaccine development has been based on the use of HIV envelope (Env) structural protein as an immunogen to induce sterilizing immunity. However, no protection was obtained in preclinical and clinical trials, as a result of Env variability. More recently, novel modified Env proteins have been developed that better expose conserved epitopes, thus being superior immunogens to those used in the past, inducing broader immunity and overcoming the intra- and inter-clade variability-related issues for efficacious vaccination. On the other hand, further *in vivo* studies proved that vaccines based on HIV regulatory proteins (Tat, Rev, Nef) are safe and immunogenic in mice, monkeys, and humans, and able to contain virus replication and to prevent disease onset in monkeys. In addition, immune responses against regulatory viral antigens correlate with non progression to AIDS in humans. Further, regulatory viral proteins are highly conserved among different HIV clades and have immunomodulatory functions that can be exploited for vaccine design. For all of these reasons, a vaccine combining both regulatory and novel structural HIV antigens (combined vaccine) is likely to be superior to the single-antigen type approach, since immune responses to both early and late viral products would be induced. In particular, a vaccine based on the rational combination of an Env variant that contains a deletion in the V2 loop of the gp120 subunit (ΔV2 Env), which allows a better exposure of neutralization-sensitive epitopes of Env, and of the regulatory Tat protein of HIV is under evaluation in small animals.

Methods: Vaccine formulations containing trimeric ΔV2 Env and native, biologically active Tat proteins of HIV, the respective single proteins, or wild type Env +/- Tat as controls, are being evaluated in terms of safety and immunogenicity in mice and in rabbits. Animals are being repeatedly immunized subcutaneously. Both humoral and cellular immunity will be measured. In particular, titers of serum viral antigen-specific binding antibodies and antibody epitope mapping will be determined by ELISA. To assess the breadth of neutralizing antibody responses, sera will also be tested for neutralizing activity in infectivity inhibition assays against a panel of primary HIV isolates of different clades. Serum anti-Tat activity neutralizing antibodies will be assessed in Tat-mediated rescue-of-infectivity assays. Cellular responses will be evaluated by gamma-interferon (IFN), interleukin (IL)-2, and IL-4 ELISpots, and by gamma-IFN and IL-2 intracellular staining. Cytotoxic T cell (CTL) epitopes will be also mapped.

Results: The Tat/ΔV2 Env combined vaccine is expected to be safe and immunogenic in both animal species. Viral antigen-specific humoral and cellular immune responses are anticipated in all vaccinated animals. Env-specific immunity is expected to be generally stronger and/or broader in animals immunized with the combined vaccine as compared to controls because of the modulation induced by Tat on the activity of the proteasome and on the broadness of CTL epitopes. In addition, trimeric ΔV2 Env is anticipated to induce broader and more potent neutralizing activity than its wild type counterpart, including neutralizing antibodies against primary HIV isolates of various clades.

Conclusions: Once immunization and immune response characterization will have been completed with promising results, further vaccine development studies will be conducted on this Tat/ΔV2 Env combined vaccine, including clinical testing.

Grant: 45F/C

CONDUCTION OF PHASE I AND PHASE II PREVENTIVE AND THERAPEUTIC CLINICAL TRIALS WITH NOVEL VACCINE CANDIDATES

Valeria Fiorelli* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Antonella Tripiciano (*); Arianna Scoglio (*); Barbara Collacchi (*); Maria José Ruiz Alvarez (*); Concetta Giannetto (*); Antonina Fazio (*); Giovanni Paniccia (*); Angela Arancio** (*IRCCS S. Gallicano, Roma*); Francesca Stivali (**); Vittorio Francavilla (*); Olimpia Longo (*); Fabrizio Ensoli (**); Barbara Ensoli (*)

Background: The inexorable spreading of HIV pandemic in the developing countries underscore the urgency for an effective, safe and inexpensive vaccine against AIDS. New strategies have been recently developed targeting regulatory proteins, the first to be expressed after infection, essential for viral replication, infectivity and pathogenesis. Based on this strategy, a Tat vaccine, proven to be safe, immunogenic and effective in animal models, has been developed for Phase I preventive and therapeutic clinical trials. Both trials are ongoing and completion is planned by June 2005. Phase II clinical trials of the Tat based vaccine are anticipated to start soon after completion of the phase I studies. In addition, novel approaches aimed to improve immunogenicity and efficacy, based on the combinations of structural and regulatory gene products of HIV-1, will be evaluated in preclinical studies and are expected to start clinical development within the next years.

Methods: In order to conduct phase I and II trials in HIV infected and uninfected individuals, and to guarantee high levels of internal and external quality controls, all clinical evaluation (clinical platform) and laboratory procedures (laboratory platform), as well as communication, psychosocial and behavioural assessments (socio-ethical platform) must be harmonized along common GCP/GLP procedures. Principal objectives of such harmonization include: a) definition of SOPs; b) training of personnel among clinical centers and laboratories.

Results: Harmonization of the clinical platform is achieved by the preparation, in addition to clinical protocols, investigator brochure, informed consent and case report form, of SOPs to standardize critical steps in the setting of clinical trials. These include: communication and enrollment procedures; prescreening procedures; vaccine storage and administration; adverse events management; blinding/unblinding procedures; collection and shipment of biological samples. The immunological evaluation will apply standardized criteria. Quality control and training represent an important component of the platform. The standardized assays include: a) Humoral immunity: titration of specific IgG, IgA, IgM; B-cell epitope mapping; b) Cell-mediated immunity: antigen-specific T cell responses (IFN γ , IL-2, perforin, IL-4 ELISpot assays); ICCS for IFN γ and IL-2 combined with phenotypic analysis, T cell proliferative assays by CFSE staining; cytokine release by multiparametric analysis. c) Natural/innate immunity: NK cell activity (measurement of perforin), production of CCR5-binding chemokines and α -defensins. d) HLA typing. A psychosocial protocol will complement prescreening procedures in order to identify volunteers that may need specific psychological support throughout the trial and at critical points during the study such as enrollment, conclusion of the study and follow-up, and in case of screening failure and adverse events. This protocol is based on validated and standardized psycho-behavioral testing and will also contribute to reducing dropouts from the study.

Conclusions: A Clinical Development Plan (CDP) has been established based on the harmonization of clinical, laboratory and socio-ethical platforms, to conduct of phase I and II clinical trials in HIV- and HIV+ individuals. The harmonization within the CDP is fundamental to achieve clear and comparable read-outs from the trials of the different vaccine candidates performed in a multicenter context.

Grant: 45F/C

EPIDEMIOLOGY OF VIRAL INFECTIONS IN GUINEA BISSAU AND IN ZANZIBAR

Massimo Galli* (*Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi di Milano*); Agostino Riva (*); Stefano Rusconi (*); Francesco Croce (*); Erika Gianelli (*); Benedetta Massetto (*); Paolo Fedeli (*)

Background: In Guinea Bissau there has been no HIV sentinel surveillance among women attending antenatal care clinics since 1996. From the mid-1980s to 1995 HIV-1 prevalence among antenatal clinic women increased gradually from no HIV-1 infection to 2.7% in 1995. With the collaboration of the Association "Cielo e Terre" we promoted awareness of HIV/AIDS and provided VCT and PMTCT. In Zanzibar 2729 patients have been enrolled in six referral hospitals both in Unguja and Pemba. A blood sample and a questionnaire regarding socio-demographic data and behavioural activities were anonymously collected for each participant.

Methods: We analyzed the prevalence of HIV-1, HIV-2, HBV, HCV and HTLV-1 in pregnant women in Bissau. HIV status was verified using Genie II HIV1/2 (BioRad) and a blood dried spot was collected for subsequent ELISA testing for HBV, HCV and HTLV-1. MTCT prevention relied on a single dose nevirapine to the mother during labour and single dose nevirapine to the child within 72 hours from delivery. Formula feeding was implemented.

Results: In Bissau since January 2002 15,753 pregnant women were counseled and tested for HIV. The prevalence of HIV-1 is 4.87%, HIV-2 1.57% and HIV 1 and 2 coinfection 0.91%. We reported initial refusal of testing because of fear and distance from the antenatal clinics, expansion of the program to 14 antenatal clinics allowing easy access and the availability of a psychologist greatly increased acceptance. Currently 350 children born to HIV-infected women are followed up; 94 of them reached 18 months of age and were tested for HIV showing a transmission rate of 3.76% demonstrating the efficacy of nevirapine and artificial feeding. 16.1% of pregnant women resulted positive for HbsAg with a prevalence of 31.8% in HIV-infected women. 7% of pregnant women resulted positive for HCV and 5% for HTLV-1 antibodies without significant difference between healthy and HIV infected women. In Zanzibar the average level of HIV prevalence is 2.9%; Sentinel groups show lower rates, as 2.1% for blood donors and 1.4% for pregnant women attending antenatal clinics are HIV-affected. TB ward attendees represent the highest-risk group for HIV infection (9.3% HIV-affected patients). A statistically significant correlation with HIV infection was found with level of education and job occupation: higher scholastic level is protective against the transmission ($r.r = 0.5$, 95% C.I. 0.292-0.2967 $p=0.039$) while mobil workers are at higher risk of being infected ($r.r=7.85$, 95% C.I. 2.058-29.967, $p=0.03$). Blood donors and pregnant women were also tested for HTLV antibodies and Hbs antigens The HTLV prevalence was respectively 3.7% e 1.9% for blood donors and pregnant women, and 4.6% e 4.2% for HBV infection. Finally, 5.2% of blood donors resulted HCV-abs seropositive.

Conclusions: Our data demonstrate a significant increase of HIV-1 prevalence in Bissau and the urgency of adequate prevention campaign. To increase acceptability of the test it is fundamental to improve pre-test counselling, provide psychological help and increase the number of antenatal clinics in order to simplify access. Given the recent data on emergence of resistance to nevirapine in women receiving nevirapine at delivery, despite its efficacy a switch to other regimens is necessary.

Grant: 45F.17

DEFINITION AND PREPARATION OF INFORMATION MATERIAL FOR SERONEGATIVE AND SEROPOSITIVE INDIVIDUALS TO BE ENROLLED IN CLINICAL TRIALS

Pietro Gallo* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Corrado Valvo (*GITA*); Rudi Valli (*)

Background: In performing an HIV vaccine trial, its psychological impact on participants must be taken into consideration, not only for ensuring these individuals' wellbeing but also for reducing potential withdrawal from the trial. To this end, it is important to consider the information needs of participants. The present project has been developed in an attempt to meet these needs.

Overall objective

The project's overall objective is to provide both seronegative and seropositive volunteer participants in HIV vaccine trials with detailed information regarding participation in these trials.

Specific objective

The project's specific objective is to develop a coherent information package (both printed and multi-media) on the various phases of an HIV vaccine trial, including an information pamphlet on informed consent, so as to allow potential.

Methods: The methods for developing this project can be summarised as follows:

– Stage 1, expected to last from six to eight months, will consist of:

- Preliminary meetings between participants and representatives of the Community Advisory Board (CAB), so as to define the information needs of seropositive and seronegative volunteers;
- Writing of the text to be included in the paper pamphlets;
- Designing of the graphics of the information material.

– Stage 2, expected to last from four to six months, will consist of:

- Realisation of the paper pamphlets;
- Planning and realisation of the web-site, which will include the multi-media information material.

Results: Adequately responding to the information needs of trial participants by providing targeted information is expected to result in greater adhesion to the trial and to allow participants to be well informed during both the enrolment phase and the trial itself, ultimately reducing the risk of drop-out.

Conclusions: The success of the project in terms of meeting the objectives will be evaluated once the final results are available.

Acknowledgements

The authors wish to thank Mark Kanieff for editing the text.

Grant: 45F/D

IMMUNO-MODULATORY EFFECTS OF THE HIV TAT PROTEIN FOR NEW VACCINE DESIGN AGAINST AIDS

Silvia Cellini* (*Università degli Studi di Ferrara*); Eleonora Gallerani (*); Cinzia Fortini (*); Francesca Gagliardini (*); Egidio Brocca Cofano (*); Aurelio Cafaro** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Antonella Caputo (*); Barbara Ensoli (**); Riccardo Gavioli (*)

Background: Cytotoxic T cells (CTL) play an essential role in the control of HIV infection. Thus, vaccine formulations that target professional antigen presenting cells, promote Th-1 responses, or optimize the generation and presentation of CTL epitopes within the antigen vaccine may afford better protection against HIV/AIDS. The HIV-1 Tat protein is produced early upon infection to promote virus replication and transmission. It has been shown that vaccination with Tat protein or tat DNA protects monkeys against challenge with pathogenic simian/human immunodeficiency virus and that protection correlates with the presence of Th-1 responses and anti-Tat CTL. Furthermore, Tat induces maturation of dendritic cells favouring Th-1 responses, and modifies the catalytic subunit composition and enzymatic activities of proteasomes resulting in a more efficient generation and presentation of subdominant and cryptic CTL epitopes within model antigens. These immunomodulatory properties of Tat may be exploited for the development of new vaccines based on combination of Tat with structural HIV antigens. Molecular dissection of the immunomodulatory activities of HIV Tat may allow the design of new HIV/AIDS vaccines that take advantage of its double role as antigen and novel adjuvant. It is surmised that the capacity of Tat to refocus immune responses to subdominant and cryptic epitopes will minimize the selection of escape mutants and improve vaccine efficacy.

Methods: To address the effect of Tat on epitope specific T cell responses directed to Gag antigen, BALB/c mice were vaccinated with the HIV-1 Gag protein alone, or in combination with the Tat protein. The presence of peptide-specific T cell responses was evaluated by IFN- γ Elispot assays using fresh splenocytes stimulated with pools of peptides spanning the entire sequence Gag protein using a peptide-based matrix approach. Matrices consisted of pools of peptides in which each peptide was present in two separate pools. Responses were regarded as positive if they had at least 10 SFU/well and three times the mean number of SFU in the control wells.

Results: Mice immunized with Gag alone responded to 7 peptide pools, whereas mice immunized with both Gag and Tat responded to 11 peptide pools. Control mice did not respond to any of the pools. We then assayed 36 individual peptides identified as potential targets by the matrix approach. Splenocytes from mice immunized with Gag alone responded to 5 different peptides. In contrast, mice immunized with Gag and Tat responded to 10 different peptides.

Conclusions: We have shown that native HIV-1 Tat protein modulates *in vivo* epitope specific T cell responses to the HIV-1 Gag antigen. In particular, we have demonstrated that mice vaccinated with Gag, in combination with wild-type Tat responded to 10 T cell epitopes, in contrast to mice vaccinated with Gag alone, which responded to 5 T cell Gag-derived epitopes. These observations, together with our previous findings, suggest that Tat is not only an antigen but also a novel adjuvant capable of increasing T cell responses against heterologous antigens. Therefore, the Tat protein may represent an important tool in HIV-1 vaccine strategies aimed at broadening the spectrum of the epitopes recognized by T cells.

Grant: 45F.18

NOVEL STRATEGIES FOR ANTI-HIV IMMUNIZATION

Ennio Tasciotti* (*International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, (ICGEB), Trieste*); Miguel Gomez Lim (*Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV-Irapuato, Mexico*); Mauro Giacca (*)

Background: In the context of the ICAV project, we have started the development of two novel strategies for anti-HIV immunization using the Tat protein as a target antigen. The first approach entails the delivery of functionally active Tat using viral vectors based on the adeno-associated virus (AAV); the second approach consists in the production of a genetically modified tomato plant expressing Tat in tomatoes.

Results: AAV is a dependent parvovirus largely diffused in the normal population, which is now largely exploited as a gene delivery vector for human gene transfer. In order to assess the feasibility of antigen expression using AAV, we have optimized gene delivery to skeletal muscle and dermis using AAV vector expressing the reporter genes GFP and LacZ. Infectious vector preparations containing 1×10^{10} to 5×10^{10} viral particles were used to inject mice in the tibialis anterior muscle and in the dermis; animals were sacrificed at day 3, 7, 14, 30 and 90 after injection. Transgene expression reached a plateau around day 14 and remained constant thereafter. No appreciable sign of inflammation was detected in the injection sites, with the exception of a faint infiltration of mononuclear cells, that disappeared within the first week. AAV-mediated gene delivery to the skin mostly resulted in the transduction of the panniculus carnosus in the dermis. Next we produced AAV vectors expressing the wt HIV-1 Tat protein or a modified version of this protein bearing an N-terminal fusion with the IgG leader sequence, which provides a secretory signal. We injected the two vectors into both the skeletal muscle and in the dermis of mice. No histological modification could be detected over time. Mice started to develop a serological response against Tat 3 weeks after transduction; we are currently testing the evolution of the antibody response over time. We also obtained a transgenic tomato constitutively expressing the HIV-1 Tat protein. These tomatoes were shown to produce relatively abundant levels of Tat (as detected by western blotting), which was functionally active (as concluded by its capacity to transactivate an HIV-1 LTR reporter cassette). Wt- and Tat-tomatoes were used for three different immunization approaches. Lyophilized extracts were reconstituted in saline buffer, centrifuged and the soluble fractions were injected intraperitoneally (ip) and intramuscularly (im) together with Freund adjuvant in CD1 female mice. In addition, to understand whether it is possible to achieve animal immunization by means of oral feeding, animals were also fed with the reconstituted tomato extracts. We evaluated the intensity of antigen-specific humoral response prior to and at different intervals after vaccination. Oral feeding was found to induce an anti-Tat immune response that was similar to that obtained by ip and im immunizations. We also assessed the titres of IgM, IgA and IgG-subclasses. Interestingly, we detected the presence of mucosal immunity (IgA) in the sera, vaginal washes and faeces of Tat-tomato fed animals.

Conclusions: The combined features of the Tat antigen and the potential of the two newly developed expression and delivery systems may pave the way towards the development of a new vaccine against HIV.

Grant: 45F.19

DEVELOPMENT OF SUBGENOMIC HIV AND SIV EXPRESSION CONSTRUCTS FOR GENETIC IMMUNIZATION STUDIES

Stefano Indraccolo* (*Dip. di Oncologia e Scienze Chirurgiche, Università degli Studi di Padova*);
Sonia Minuzzo (*); Valeria Tosello (*); Lidia Moserle (*); Rita Zamarchi (*); Alberto Amadori (*)

Background: Gag-derived immunogens seem to be useful for vaccine development because the protein is relatively well conserved among diverse HIV-1 subtypes and broad cross-clade CTL recognition directed against Gag targets has been documented. Genetic immunization is a promising vaccination approach but its efficacy is limited by the poor expression of HIV and SIV structural genes in mice following their injection as plasmid DNA, as we and others have observed. The development of molecular adjuvants to improve the efficacy of DNA vaccination against SIV Gag is highly desirable, because it could favour the evaluation of candidate vaccines in small animal models. In this study, we evaluated the effect of VP22, a component of the herpes simplex virus tegument which has been reported to act as an intercellular carrier of proteins, on SIV Gag expression.

Methods: A plasmid encoding VP22-Gag has been generated and used in transient transfection experiments to evaluate the expression of VP22-Gag fusion protein compared to SIV Gag-encoding constructs. Flow cytometric analysis has been used to investigate the expression of VP22-Gag in transfected cells and its possible spreading to non-transfected surrounding cells. Northern blot and immunoprecipitation studies have been performed to measure the half-life of VP22-Gag mRNA and protein, respectively.

Results: We have shown dramatically increased expression of VP22-Gag, compared to parental SIV Gag, in transfected 293T and HeLa cells. This seems to depend on the stability of VP22-Gag mRNA in the absence of the Rev/RRE system or constitutive transport elements (CTE). VP22-Gag localizes in the cytoplasm of the transfected cells, with a granular pattern of staining, while VP22 has a predominant nuclear localization. VP22 protein does not increase SIV Gag expression in trans. Finally, spreading of VP22-Gag to non-transfected cells is apparently not observed.

Conclusions: This study describes a novel function of the HSV-1 VP22 ORF: it improves the expression of the unstable SIV gag mRNA in transfected cells, without evidence of export of the fusion protein to surrounding cells. Fusion of VP22 to SIV genes may thus represent a novel strategy to improve the expression of the structural viral genes for immunization studies.

Grant: 45F.21

IMPLEMENTATION AND USE OF THE HU-PBL-SCID MOUSE MODEL FOR STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF ANTI-HIV VACCINES

Caterina Lapenta* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Stefano Maria Santini (*); Massimo Spada (*); Simona Donati (*); Filippo Belardelli (*)

Background: Implementation and use of the Hu-PBL-SCID mouse model for studies on the development of anti-HIV vaccines. Caterina Lapenta, Stefano M. Santini, Massimo Spada, Simona Donati and Filippo Belardelli Dept. of Cell Biology and Neurosciences - Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy. SCID (severe combined immunodeficient) mice are characterized by a severe immunologic defect and are profoundly deficient in both humoral and cellular immunity due to the lack of mature B and T cells, thus allowing the transplantation of allogeneic and xenogeneic tissues or cells without rejection. Both normal and neoplastic human cells efficiently engraft immunodeficient mice and this specific feature has rendered feasible the *in vivo* investigation of selected aspects of HIV infection and AIDS. Human peripheral lymphocytes are injected intraperitoneally in SCID mice and persist in the peritoneal cavity and organs for several months. The resulting human-mouse xenochimeric animals are called hu-PBL-SCID mice. Hu-PBL-SCID mice have been widely used in our laboratory to perform immunological studies *in vivo* by using human dendritic cells (DCs) pulsed with HIV-1 antigens and to evaluate the effect of HIV-1 infection on selected immunological and viral parameters.

Methods: SCID mice are reconstituted by intraperitoneal injection of human PBLs from healthy donors. Autologous monocytes are used as source for generating DCs by culture in the presence of different cytokine combination (i.e., either GM-CSF and IL-4 or IFN- α and GM-CSF). DCs are then pulsed with aldrithiol-2 (AT-2)-inactivated HIV-1 and injected into hu-PBL-SCID mice 3 days after reconstitution. Different immunization protocols are compared. Sera from control and vaccinated hu-PBL-SCID mice are collected at 7 and 14 days, and tested for the presence of human antibodies against defined HIV antigens by ELISAs. Sera are also assayed for *in vitro* antiviral neutralizing activity toward laboratory HIV strains or clinical primary isolates. Culture supernatants are tested for p24 production by a HIV-1 p24 ELISA.

Results: Immunization of hu-PBL-SCID mice with AT-2-HIV-pulsed DCs generated in the presence of IFN- α (IFN-DCs) proved to be the best strategy for inducing the generation of high levels of antibodies to HIV-1 antigens exhibiting *in vitro* neutralizing activity against HIV-1. Two injections of virus pulsed IFN-DCs followed by a boost inoculation of AT-2-HIV alone was the best protocol for the induction of human CD8⁺ T cells against HIV antigens (Lapenta *et al.* J. Exp. Med. 198:361, 2003). During this last year, we have also shown that IFN-DCs are superior with respect to CD40-L-matured IL-4-DCs in inducing cross-priming of CD8⁺ T cells against exogenous HIV-1 antigens when injected into hu-PBL-SCID mice, as assessed by ELISPOT assay for the detection of IFN- γ and Granzyme-B producing cells using human CD8⁺ T cells recovered from the immunized animals (Lapenta *et al.* submitted for publication).

Conclusions: The hu-PBL-SCID mouse model can be implemented by different strategies based on the transfer of DCs and other human immune cells and could be considered as a valuable practical model for *in vivo* studies on the development of anti-HIV vaccines. Recently, experimental protocols have been designed to test the immunogenicity of new HIV-1 vaccines candidates in the hu-PBL-SCID mouse model by using the selected immunogens, alone or in association with different types of DCs.

Grant: 45F/E

ESTABLISHMENT OF NOVEL ASSAYS FOR EVALUATING PROTECTION CORRELATES AND DEVELOPMENT OF NOVEL IMMUNOGENS BASED ON HIV-1 ENV/CD4 COMPLEXES

Lucinda Furci* (*DIBIT, Milano*); Fabio Santoro (*); Lia Vassena (*); Monica Tolazzi (*); Francesca Sironi (*); Samuele Burastero (*); Paolo Lusso (*)

Background: The identification of reliable correlate markers of vaccine-elicited protection is essential for the evaluation of new candidate vaccines. To be able to elicit the production of broadly active neutralizing antibodies, vaccine candidates must be able to present to the immune system highly conserved neutralization epitopes that are cryptic in the native conformation of the HIV-1 envelope.

Methods: Establishment and validation of novel assays for correlate markers based on calibrated real-time (TaqMan) PCR, ELISA, intracellular staining, infectivity reduction in acute HIV-1 infection assays in primary human PBMC, MAGI single-cycle infection assays and fusion inhibition assays. Immunization of Balb/c mice with syngenic cells (NIH-3T3) infected with recombinant vaccinia viruses expressing native HIV-1 envelope gp120/gp41, in complex or not with soluble CD4 (sCD4).

Results: We have established and validated new quantitative assays for the measurement of soluble suppressive factors, with particular focus on crude suppressive activity (so-called CAF), as well as on specific chemokines and defensins. Preliminary data indicate that CD8+ T cells derived from both long-term non-progressors and HIV-exposed-uninfected subjects produce significant amounts of HIV-SF. However, HIV-SF production is also detected in selected healthy uninfected individuals. We have also developed several types of assays for measuring the presence and efficacy of HIV-neutralizing antibodies, with a special emphasis on the distinction between pre- vs post-viral entry neutralization. All of these assays are based on primary HIV-1 isolates minimally passaged *ex vivo*. Finally, we have established and validated target-binding assays for evaluating the ability of anti-Env antibodies to bind to the surface of the native envelope of primary HIV-1 isolates presented in the fully "native" conformation, as a surrogate marker of neutralization. To develop novel immunogens capable of eliciting the production of broadly active NAb, we have immunized Balb/c mice with syngenic cells infected with recombinant vaccinia viruses expressing native HIV-1 envelope gp120/gp41, in complex or not with soluble CD4 (sCD4). To validate the immunogen, we used mAbs against well-characterized CD4-induced epitopes, such as 17b and 48d, demonstrating a markedly increased reactivity after CD4 treatment. Similar reactivity was seen with mAb D19, directed against a unique "CD4-inducible" epitope within the V3 loop (Lusso *et al.*, *J. Virol.* in press 2005). Polyclonal sera obtained from mice injected with CD4/Env complex-expressing cells displayed a broader spectrum of neutralization of HIV-envelope-mediated cell fusion, as compared to sera from mice injected with cells expressing the non-complexed homologous Env.

Conclusions: These data identify potential correlate markers of protection and suggest that the unraveling of conserved neo-epitopes induced in the native gp120 after CD4 binding can be a viable strategy for a protective HIV vaccine.

Grant: 45F.23

INVOLVEMENT OF THE COMMUNITY ADVISORY BOARD (CAB) IN THE DESIGN OF PREVENTIVE AND THERAPEUTIC CLINICAL TRIALS

Anna Maria Luzi (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Simone Marcotullio (*Vaccine Working Group, Modena*)

Background: The current project concerns the active involvement of the community (most representative NGOs) in the design of the clinical trials with the role of Advisory in all the critical steps, being them decisional and/or co-decisional. The community of PLWHA (People Living with HIV/AIDS), as hystoriacal achievement, nowadays plays an important role of advisory at all scientific and social levels, with institutions and/or in the private sector. It's crucial the involvement of a full representative CAB, composed by the main rapresentative NGOs at proper level, being this level national or international, in all the processes that concern voluonteers in HIV/AIDS vaccine clinical trials.

Methods: 1)The CAB should consititute itself, giving itself a clear regualation approved (description af activity, roles...), operating at all the potential decisional levels throght its rapresentatives;

2) Involvement at all the meetings decided to be crucial regarding Vaccine Clinical trials (VCTs);

3) Activities 1 & 2 done at the levels of the steering comettees, operational meetings, specific meeting, all kind of meetings decided to be necessary;

4) Assuring the involvement of other community rapresentative when needed (ex: local level, for instance, counselling to vaccine volounteers.

Results: [Expected results]The full involvement of the CAB, that means the community of PLWHA, in the design of an HIV/AIDS Vaccine clinical trial, with the result of having rapresented the community of PLWHA in all the decision processes, with a clear indipendent advisory role in all the processes related to the design of a VCTs.

Conclusions: Nowadays the involvement of PLWHA is mandatory, especially considering new preventive and therapeutical strategies, as VCTs are, that potentially can rise ethical, not easy to be solved, problems and challenges.

Grant: 45F/F

TRAINING OF PSYCHO-SOCIAL AND CLINICAL PROFESSIONALS TO SUPPORT COUNSELLING AND COMMUNICATION WITH SEROPOSITIVE/SERONEGATIVE VOLUNTEERS INVOLVED IN CLINICAL TRIALS

Anna Maria Luzi* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Barbara De Mei (*); Giove Bevacqua (*Positifs*)

Background: In HIV vaccine trials, the relationship between participants and psycho-socio-health professionals is fundamental, given that participants may experience psychological and social distress. Professionals must thus understand the participants' psychological and emotional needs and place these needs in their context. This requires establishing an interpersonal relationship based on open communication, helping participants to confront anxieties by focussing on the true problem and stimulating them to use their own resources. In this light, traditional training must be integrated with teaching-learning initiatives geared towards communicational and relational skills, in particular, certain counselling skills (which are essential for managing interpersonal relationships in which effective communication is required) and counselling strategies (i.e., informative-, crisis-, problem-solving-, and decision-making-counselling). The project "Training of psycho-social and clinical investigators to support counselling and communication with seropositive/seronegative volunteers involved in clinical trials" is being developed to provide training for addressing communicational-relational issues in the "Italian concerted action for the development of a vaccine against HIV/AIDS".

Overall objective

To define good communicational-relational practices in the various trial phases

Specific objectives

To evaluate the qualifications of the professionals comprising the clinical teams; To identify the necessary conditions for integrating these professionals into the team; To identify the principles of effective communication and strategies for improving communication, focussing on the relationship with one's self, with HIV-positive and negative trial participants, and with the team; To identify the principles of, and techniques for developing, a relationship with the trial participants during the various phases (both phone and vis a vis counselling); To identify criteria for developing effective communication; To identify counselling steps; and To identify and activate counselling skills.

Methods: A 40-60-hour training course will be developed. The course can be divided as follows: An introductory unit on the epidemiological situation of HIV/AIDS and on clinical experimentation, with both theoretical and practical learning; A first unit on counselling, specifically, its application and the fundamentals of communication; A second unit on theoretical/practical knowledge related to listening, empathic communication, clinical talk leading as a cooperative alliance, problem-solving cases and role-playing; and A third unit on the application of counselling to clinical experimentation. The teaching methods will be interactive and consist of theoretical lessons, integrated with group work, group presentations, role-playing, and collective discussions. Participants will be provided with a teaching package and related readings.

Results: Training in effective communication skills and counselling abilities is fundamental for meeting the objectives of the different trial phases. Improving the effectiveness of communication and the relationship between professionals and trial participants is indispensable for:- Increasing trial participants' awareness;- Facilitating recruitment procedures and reducing the risk of drop-out; and- Preventing professional burn-out.

Conclusions: The success of the project in terms of meeting the objectives will be evaluated once the final results are available.

Grant: 45F/F

ANALYSIS OF CD4+CD8+ DOUBLE POSITIVE T CELLS DURING INTRARECTAL INFECTION OF CYNOMOLGUS MONKEYS WITH SHIV896P

Iole Macchia* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Donatella R. M Negri (*); Silvia Baroncelli (*); Roberto Belli (*); Stefania Catone (*); Piergiorgio Pupino Carbonelli (*); Andrea Cara (*); Aurelio Cafaro (*); Fausto Titti (*); Barbara Ensoli (*)

Background: Peripheral blood CD4+CD8+ double positive (DP) lymphocytes are a subset of circulating T cells co-expressing CD4 and CD8 molecules, described in humans and in several species of non-human primates, including rhesus macaques (*Macaca mulatta*) and cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). Data in the literature indicated that these cells are mature antigen-specific effector memory cells and they may play an important role in immune response against viral infections. Our previous data obtained from rhesus monkeys, indicated that CD4+CD8+ DP T cells can be divided in a dominant subset of cells, represented by CD4hiCD8lo T cells and a minor subset, represented by CD4loCD8hi cells. The dominant pool appeared as an antigen-experienced subset of functional cells expressing cytolytic and proliferation markers and able to respond to different viral antigens. Furthermore, previous *in vitro* and *in vivo* studies demonstrated the susceptibility of DP T cells to HIV/SIV infection. In accordance with previous reports in the SIV/cynomolgus macaque model, our longitudinal analysis in rhesus macaques demonstrated a progressive depletion of DP cells, in parallel with CD4+ single positive (SP) depletion, during the course of pathogenic SIV infection. In order to investigate the effect of mucosal challenge on CD4+CD8+ DP T cells, in the first part of this project we focused on the the analysis of frequency and kinetic of this subpopulation of lymphocytes in cynomolgus monkeys infected intrarectally with the pathogenic SHIV89.6P virus, an animal model for pathogenesis of HIV.

Methods: Cynomolgus monkeys were infected intrarectally with SHIV896P. Measurements of SHIV RNA levels in the plasma were performed using a Real Time RT-PCR analysis (cut-off: 50 RNA copies/ml). The absolute number and frequency of CD4+ SP and CD4+CD8+ DP lymphocytes were evaluated by surface staining and FACS analysis. Kinetics of the CD4+ SP and CD4+CD8+ DP cells was also correlated with the clinical and immunological status of monkeys during the course of infection.

Results: After intrarectal challenge, six animals became overtly infected with a peak of plasma viremia at week 2 post infection; the other six animals remained uninfected, as measured by plasma viremia levels. In contrast to previous findings, only the dominant subset of DP cells, represented by CD4hiCD8lo T cells, was present in all monkeys of this study. Longitudinal analysis revealed, in infected animals, a slight increase in the percentage and absolute number of CD4+CD8+ DP T cells at week 2 post infection (p.i.), followed by a significant reduction at week 4 p.i., paralleling CD4+ SP cells depletion and SHIV896P replication. Conversely, in the uninfected animals, levels of both CD4+CD8+ DP T and CD4+ SP T cells remained stable over time.

Conclusions: The cynomolgus macaque/SHIV model offers the opportunity to better characterize the CD4+CD8+ T lymphocytes and to study their role in mucosal primate immunodeficiency virus infection. The decline of circulating DP T cells during infection suggests that this subpopulation of T lymphocytes might be target of SHIV 89.6P infection. Further analysis of expression of memory/naive (CD28, CD45RA) and activation (HLA-DR) markers, will be performed in order to characterize the phenotype of CD4+CD8+ DP cells during the course of infection. In addition, DP lymphocytes will be studied during immunization of monkeys with different vaccine candidates, in order to assess their contribution to the vaccine-induced immune control to viral infections.

Grant: 45F/C

EFFECTS OF HIV PROTEINS ON TREG CELLS AND ROLE OF HIV-PROTEIN SPECIFIC CD8+ T CELL RESPONSE IN HIV-INFECTED INDIVIDUALS

Enrico Maggi* (*Università degli Studi di Firenze*); Francesco Annunziato (*); Francesco Liotta (*); Veronica Santarlaschi (*)

Background: The project includes three subtasks inside the workpackages 1, 2, 6. The aim of the WP1 concerns the effects of recombinant HIV Tat, Nef and Rev proteins on phenotypic and functional features of Treg cells. The objectives of WP2 and WP6 concern the evaluation of CD8+ T cells specific for immunodominant epitopes of HIV proteins on untreated/HAART-treated patients (WP2) and then on those enrolled for preventive or therapeutical vaccination (WP6).

Methods: WP1- Treg cells (CD4+CD25^{high} or CD8+CD25^{high}), obtained by sorting procedures from PBMC of seronegative healthy donors and from thymus specimens from children undergoing cardiosurgical interventions, have been activated with anti-CD3 plus anti-CD28 (plus IL-2) in order to evaluate their activation patterns at day 3. WP2,WP6: Initially we selected some LNTP (8), MEU (5), and Progressors HIV-infected subjects (12) to be used in the study. All selected people were screened for their MHC class I aploptype (HLA-A2, A14). Then we identified immunodominant peptides of HIV Tat, Nef, Rev and Gag by using data present in literature or through a dedicated software: ProPred: prediction of HLA binding sites, which predicts the peptides with the highest binding affinity for known HLA class I molecules on the basis of the antigen linear sequence. Lastly, the HLA-A2 (or A14) construct containing the immunodominant peptides have been constructed by PCR amplification with a HLA-A2 (or A14) plasmid as template. Briefly, plasmid (with the expression vector containing Class I heavy chain PCR product) have been transformed into *Escherichia coli* and protein expression and purification has been carried out according the standard protocols. Thenafter soluble MHC class I heavy chain has been refolded *in vitro* in the presence of beta-2 microglobulin and of the relevant peptide. Refolded MHC Class I complexes has been biotinylated and lastly purified by fast performance liquid chromatography and ion-exchange chromatography before the addition of avidin-phycoerythrin (PE) conjugate.

Results: WP2: Thymic and circulating Treg cells displayed polyclonal TCR features (studied by anti-Vbeta chains mAbs) and expressed CD25, TNFR2, TGF-beta1R, CCR8 and CTLA4 on their membrane. In addition, they showed mRNA expression for GITR (glucocorticoid-induced TNF-R) and Foxp3 (the key transcriptional factor for the development of T-cell suppressive activity). Preliminary data on the effects of HIV-derived products on the previous parameters have been achieved. In addition the activity of Tat protein has been evaluated on some functional parameters of Treg cells (cytokine and chemokine production, chemotaxis, apoptosis) as well as on their suppressive activity on other effector cells (allo-MLR, antigen-specific T cell response, proliferation and differentiation of B cells to ODNs). WP2, WP6: Preliminary data on the proportions of circulating CD8+ T cells specific for peptides have been obtained in CMV acute infection and in some HIV progressors. Positivity for tetramers in CD8+ T cells has been directly associated (by multiparametric analysis) to other phenotypic molecules (i.e. CD38, Class II DR antigen, CD95, CD178, CD40L, etc.), cytokine and chemokine receptors as well as to intracytoplasmic cytokines (IFN-gamma, TNF-alpha, etc) and perforins.

Conclusions: The activity of HIV proteins on Treg cells and of the CD8+ T cells specific for these molecules allow to monitor different phases of infection as well as of therapeutical interventions.

Grant: 45F.24

FROM RESEARCH GRADE TO GMP GRADE PRODUCTION OF HIV-1 TAT PROTEIN: AN ASSESSED VACCINE CANDIDATE

Maria Elena Laguardia* (*CBA, Genova*); Diego Moricoli (*); Damiano Carbonella (*); Giordano Serafini** (*Università degli Studi di Urbino*); Sabrina Dominici (**); Valeria Fiorelli*** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Barbara Ensoli (***) ; Mauro Magnani (**)

Background: Tat is a regulatory protein that is produced early after infection and is essential for virus replication and infectivity[1]. The Tat protein of HIV-1 (HTLV-III_B strain, clone BH-10) is a molecule of 86 aminoacids encoded by two exons. The product of the first exon is sufficient for the transactivation of the HIV-1 promoter. This region contains four domains including the aminoterminal domain (aa 1-21), the cystein-rich domain (aa 22-37), the core (aa 38-48) and the basic domain (49-57). The cystein-rich region is necessary for zinc ion-mediated dimer formation and represents the transactivation domain. The basic region, rich in lysine and arginine residues, is required for nuclear localization and can bind specifically to its RNA target, the transactivation response element (TAR) in the LTR[2]. The C-terminal 14 aminoacid of Tat that is encoded by exon 2 is not necessary for HIV-1 LTR transactivation but contains the arginine-glycine-aspartate (RGD) sequence which is a motif present in extracellular matrix proteins [3]. This region and the basic domain are required for the interaction of extracellular Tat, with cell surface molecules of the integrin family and with heparan-sulfate proteoglycans, respectively, and mediate uptake of Tat by dendritic cells (DC) [4]. The active substance of the anti-HIV-1/AIDS Tat-based vaccine is represented by the recombinant Tat protein.

Methods: The recombinant biologically active Tat protein utilized for clinical trial has been obtained from a lysate of engineered E.coli cells. Briefly, the pET3c-Tat and pLysS plasmids were constructed and optimized for Tat expression. The plasmid was transferred in an E.coli strain, BL21(DE3), selected for optimal growth and protein expression. The final product was purified by a combination of a ion exchange and affinity chromatography with a yield of 12 mg of homogeneous Tat per liter of bacterial culture and characterized for purity, identity, potency, sterility, quantity and impurities. All procedures have been developed up to a 20 liter scale and the down stream process performed by semiautomatic equipments (AKTA).

Results: During acute infection, Tat is released extracellularly by infected cells [5] and is taken up by neighboring cells where it transactivates viral replication [6] and increases virus infectivity. Tat is also immunogenic and antibodies against Tat appear to have a protective role in controlling disease progression. The characterization of a biological product by appropriate techniques is necessary to allow relevant specifications to be established. Specifications are chosen to confirm the quality of the drug substance rather than to establish a full characterization, and are focused on those molecular and biological characteristics found to be relevant to ensure the efficacy of the product, represented in this particular case by the biological activity and monomeric form of the HIV-1 Tat protein.

Conclusions: The recombinant Tat protein, has been produced in good manufacturing practice (GMP) conditions in order to be approved for human use. This process has required the implementation of a scaled-up method of production in order to produce the required amount of the active substance and to comply with the acceptance criteria for product- and process-related substances. The safety and immunogenicity of the HIV-1 Tat recombinant protein was investigated in mice and monkey models, the last one represented by cynomolgus monkeys. The recombinant protein was also used to develop selected ELISA assays to follow the immunological response in HIV-1 infected patients.

Grant: 45F.25

SENSITIVITY AND ACCURACY IN MONITORING VIRUS SPECIFIC T CELL RESPONSES

Giuseppina Li Pira* (*Istituto G. Gaslini, Genova*); Laura Bottone** (*CBA, Genova*); Federico Ivaldi (**); Fabrizio Manca (*)

Background: In the perspective of studying correlates of immune protection and of vaccine efficacy, it is important to estimate CD4 and CD8 T cell responses to HIV antigens. For a better evaluation of immunocompetence of AIDS patients before and after treatment, it is also important to quantify cellular immunity to other opportunistic pathogens. Different methods have been proposed in the recent years, that allow identification and enumeration of antigen specific T cells. ELISPOT and intracytoplasmic cytokine (ICC) staining are based on cytokine secretion induced by antigenic stimulation of specific T cells. These methods have become more and more popular and reagents are available from different companies. Nevertheless, reliable studies on relative accuracy are still lacking.

Methods: In the present study we have compared these two assays not only in terms of sensitivity (which assay detects very few cells), but also in terms of accuracy (which assay provides information closer to the real situation with respect to actual frequency of specific cells). We took advantage of established T cell lines specific for HIV and for CMV, another virus relevant in AIDS patients, that contain almost 100% virus specific CD4 or CD8 T cells. These cells were defined for epitope specificity, function and tetramer binding, when available. CD4 and CD8 T cell lines were diluted into PBMC at known ratios and the frequency of antigen responsive cells was evaluated by ELISPOT and by ICC, by using standard protocols described by the manufacturers of the reagents (Mabtech, Stockholm, SE and Becton Dickinson, San José, CA).

Results: ICC based enumeration of specific T cells was much closer to the actual frequency than ELISPOT. This was the case for both CD4 and CD8 T cells specific for viral antigens of HIV and CMV. Accuracy was satisfactory with pre-defined frequencies between 10% and 0.1%. At lower frequency, accuracy dropped sharply. On the average, ELISPOT was 10-20fold less sensitive than ICC.

Conclusions: Since the assays we have compared are based on lymphocyte functions, they are susceptible to biological variations. Standardization and simplification of these assays is highly desirable, in order to provide more reliable clinical information. In spite of these drawbacks, it is evident that ELISPOT is less sensitive, but it lends itself to broad use for screening on numerous samples, because it is cheaper. ICC, in contrast, provides more accurate information, but it is more expensive and harder to propose as a field test. While ELISPOT, in fact, can be read visually with good precision, ICC requires a flow cytometer and a well trained staff.

Grant: 45F.26

NON-REPLICATING HSV-1 VIRAL VECTORS EXPRESSING SIV-1 GAG PROTEIN AS AN ANTI-HIV VACCINATION APPROACH

Aleksandra Bozac* (*Università degli Studi di Ferrara*); Elena Berto (*) ; Ilaria Lanzoni (*) ; Ilaria Volpi (*) ; Roberto Manservigi (*) ; Barbara Ensoli (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Peggy Marconi (*)

Background: In order to develop new vaccination strategies able to enhance the cellular immunity towards Tat as well as other HIV-1 proteins, a large number of viral vectors expressing HIV-1 or SIV-1 antigens are under investigation. Many of these viral vectors have been reported for their capacity to induce strong *in vivo* Th1 and CTL responses, as well as high antibody titers, against various HIV-1 gene products. Herpes simplex type-1 virus (HSV-1)-based vectors show several advantages for prophylaxis against viral infections. They have been shown: i) to elicit strong and durable antigen-specific immune responses by various routes of inoculation; ii) the viral DNA persists as an episomal element, thus eliminating the safety concerns deriving from the viral random integration into the host's DNA; iii) they carry the tk gene, encoding the viral thymidine kinase, that, in case of undesired effects, can be used, in combination with specific antiviral drugs, to kill the virus-harboring cells.

Methods: We have used HSV-1 recombinant vectors, devoided of ICP4, ICP22 and ICP27 immediate early genes. These vectors, deleted of multiple functions, are unable to produce an infectious progeny and can efficiently express exogenous antigens. The recombinant virus named T0H-gag carrying the SIV-1 gag gene under the control of HCMV immediate early promoter was obtained by homologous recombination of the pB410-gag plasmid with the HSV-1 T0Z-GFP triple mutant virus into UL41 HSV-1 locus using the previously described PacI-facilitated lacZ substitution method.

Results: A replication defective HSV-1 virus was modified in order to express the SIV-1 Gag protein under the control of HCMV immediate early promoter. The presence of the gag gene in the HSV-1 genome was confirmed by Southern blot analysis and Gag protein expression was demonstrated by Western blot. In order to determine the optimal route of recombinant T0H-gag vector inoculation required for induction of efficient anti-Gag immune response two different routes of immunization were tested. Mice were primed subcutaneously (s.c.) or intradermally (i.d.) and boosted by the same routes two weeks later. The analysis of the immune response has demonstrated that mice inoculated by i.d. but not s.c. route were able to mount a significant CTL anti-Gag response after the priming immunization. However, following an i.d. boost, only a slight improvement of anti-Gag immunity was observed in these animals, while s.c. boosting elicited a very strong antigen-specific CTL response in mice primed by s.c. route. High levels of INF-gamma were secreted in presence of Gag-derived peptides by splenocytes of mice vaccinated s.c. or i.d. with T0H-gag, while mice vaccinated with either T0-GFP control vector or PBS-A did not develop any anti-Gag specific response. IL-4 production was low but detectable in the mice immunized with T0H-gag by both routes. No significant T cell proliferation or anti-Gag antibody production was detected in T0H-gag immunized animals at any viral administration route.

Conclusions: We show in the present work that the T0H-gag replication-defective HSV-1 recombinant vector is able to elicit a Gag-specific immune response in mice. Our data indicate that recombinant HSV-1 derived vaccines are only weak inducers of CD4 T helper dependent antibody response, whereas they activate efficient long-term CD8 T cell responses. Moreover, advantages of s.c. on i.d. prime/boost immunization regimen in eliciting Gag-specific immune response are suggested.

Grant: 45F.27

ANALYSIS, STANDARDIZATION AND VALIDATION OF ROUTINE IMMUNO-PHENOTYPING PROCEDURES TO BE USED FOR VACCINE OR ANTIRETROVIRAL DRUGS ASSESSMENT IN HIV-INFECTED PERSONS IN WESTERN WORLD AND THIRD WORLD SCENARIOS

Federico Martini* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Alessia Vitale (*); Leopoldo Pucillo (*); Gianpiero D'Offizi (*)

Background: Routine CD4 T cell count determination is essential to assess the immune system and manage the health care of persons infected by Human Immunodeficiency Virus (HIV). The progression of HIV disease is related to the progressive depletion of CD4 T cells, resulting in the inability to mount effective immune responses and rendering the HIV-infected persons unable to cope with opportunistic infections or tumors that eventually cause death. The possible choice between Single-platform Technology (SPT) and Double-platform Technology (DPT) makes necessary an independent evaluation of the results obtained by the two different techniques on the same samples, in order to identify any possible incongruence.

Methods: To compare SPT and DPT accuracy and reliability on CD4 determination in HIV samples, a procedure was set-up, by which HIV routine residual samples worked in the Flow Cytometry Unit of the Clinical Pathology Laboratory were processed in double by SPT (Becton Dickinson system) and DPT (Beckman-Coulter system). In the first few months, it was possible to validate the procedure by processing 126 HIV+ samples, in order to fully implement it in the next months on a total of 1000 HIV+ samples and 500 HIV- controls.

Results: Preliminary results show that the CD4 counts obtained by the two different technologies were indeed significantly different (SPT: median 380, IQR=220-622, range 2-2420; DPT: median 471, IQR=245-693, range=1-2588; Wilcoxon matched pair signed rank test $p < 0.0001$). The difference between the two counts (median =-15.9, IQR=-58-72, range=-1067-923) was not significantly correlated with SPT CD4 counts. By analyzing the raw data, it was found that the significance was due to small groups of outliers present in both distributions. Among 126 samples, 26 (20.6%) had CD4 < 200 cells/ml by SPT, while 27 (21.4%) had CD4 < 200 cells/ml by DPT. The concordance between the two technologies represented as CD4/200 cells/ml was on 22/26 by SPT (84.6%) and on 22/27 by DPT (81.5%). In 4 patients (3.1%), SPT CD4 were < 200 cells/ml and DPT CD4 were > 200 cells/ml; in 5 patients (3.9%) DPT CD4 were < 200 cells/ml and SPT CD4 were > 200 cells/ml. On checking the results, it appeared that in 8 patients (6.3%) the lymphocyte count was very different among the two technologies (in 4 (3.1%), DPT > SPT; in 4 (3.1%), SPT > DPT), while in only 1 patient (0.8%) the CD4 percentages were different (DPT: 6.8%; SPT: 23.9%).

Conclusions: Our preliminary results show a very good agreement between the CD4 % results obtained by DPT and SPT. When the CD4 absolute count was analyzed, the results agreed in 117 patients/126 (92.8%). When a different result was obtained, it was caused by a different evaluation of lymphocytes counts, with incorrect values equally distributed between the two technologies, while a difference in CD4 percentage was only marginally obtained.

Grant: 45F.28

RECOMBINANT GRAM-POSITIVE BACTERIA FOR INTRANASAL IMMUNIZATION: CHARACTERIZATION OF THE MURINE NASAL-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE AND STUDY OF LOCAL T-CELL PRIMING

Donata Medagliani* (*Università degli Studi di Siena*); Annalisa Ciabattini (*); Anna Cuppone (*); Caterina Costa (*); Susanna Ricci (*); Gianni Pozzi (*)

Background: HIV infects the human host by the mucosal route, which represents the first antimicrobial barrier through non-specific and specific defence mechanisms. Mucosal vaccination offers several advantages over the parenteral route, including the induction of local as well as systemic immunity. The nasal-associated lymphoid tissue (NALT) seems to be particularly efficient at inducing immune response in remote effector sites such as the genital tract, as well as in the respiratory tract. Our approach to mucosal immunization is based on the use of the non-pathogenic bacterium *Streptococcus gordonii*, engineered to express heterologous proteins on its surface. The present work is aimed at studying the local and systemic immune responses to recombinant HIV mucosal vaccines with a specific focus on the nasal route of immunization. The murine NALT is studied in detail in order to develop optimal strategies for inducing local and systemic immune responses. The T-cell priming following mucosal immunization is also studied *in vivo* using the system of adoptive transfer of transgenic T lymphocytes.

Methods: Construction of recombinant strains. Recombinant *S. gordonii* strains expressing on the surface HIV and SIV antigens are constructed by using a genetic system based on the chromosomal integration of recombinant DNA. The heterologous HIV/SIV antigens are fused with the OVA T-helper peptide 323-339 that is used to assess *in vivo* priming of OVA-specific CD4+ T-cells. NALT characterization. NALT is harvested from mice and cells are characterized by FACS. *In vivo* study of CD4+ T cell priming. To study T cell priming we have established the adoptive transfer system of OVA-specific transgenic T lymphocytes. Cells are removed from DO11.10 mice, labeled with CFSE, injected into syngenic BALB/c mice, and OVA-specific T cell proliferation is assessed by FACS.

Results: *S. gordonii* strains expressing p24 and gp120 of SIVmac239 were constructed. Antigens were expressed as fusions with the OVA peptide 323-339 and the Tat CTL epitope 17-25 of HIV-1, as confirmed by western blot and FACS analysis. In order to set up and validate the procedures for studying the local immune response of mice after nasal immunization, murine NALT was carefully characterized. Structure of NALT appears as bilateral strips of non-encapsulated lymphoid tissue underlying the epithelium on the ventral aspect of the posterior nasal passages. FACS analysis performed on purified cells (about 300.000 cells/mouse) showed that 63% are B cells, while T lymphocytes represent 31%. Among T cells, 70% are CD4+ and 25% are CD8+ T cells. A comparative analysis with other lymphoid organs (PP, spleen and lymph nodes) showed a cell distribution similar to that of Peyer's Patches. The study of OVA-specific T cell priming in the NALT and in the draining lymph nodes following intranasal immunization with recombinant *S. gordonii* expressing HIV/SIV antigens is currently ongoing.

Conclusions: Recombinant strains of *S. gordonii* expressing p24 and gp120 of SIV mac239, fused to OVA 323-339 and Tat CTL epitope 17-25 of HIV-1, were successfully constructed. Mouse NALT was characterized by FACS analysis and the adoptive transfer system of OVA-specific transgenic T lymphocytes was established. Study of T-cell priming following intranasal immunization of mice with recombinant *S. gordonii* expressing SIV/HIV antigens is in progress.

Grant: 45F.29

INDIVIDUATION OF COHORTS OF ADULT SEROPOSITIVE VOLUNTEERS FOR VACCINE STUDIES AND ANALYSIS OF ANTI-TAT IMMUNE RESPONSES IN DIFFERENT STAGES OF HIV-1 DISEASE

Ivano Mezzaroma* (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Elena Pinter (*); Caterina Fimiani (*); Valeria Fiorelli** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Barbara Ensoli (**); Fabrizio Ensoli (*IFO, Roma*)

Background: The aims of the study are to individuate some general aspects useful for the identification of large Italian multicentric cohorts of seropositive volunteers potentially willing to be recruited in phase I/II trials of candidate therapeutic vaccines against HIV-1. Moreover, analysis of the presence and specificity of the immune response anti-tat during the natural course of infection as well as knowledge of the impact that currently available ARV regimens might have upon antigen-specific immune functions represent critical issues in the setting and monitoring of vaccination studies in the target population.

Methods: According with the enrollment inclusion criteria of this task, at our site the following cohorts have been selected: 1) Asymptomatic (CDC A1) subjects (or the same CD4/HIV RNA values of the ISS T-001 protocol), 2) Individuals who are under antiretroviral therapy (CDC A and/or B) with CD4+ >400/cu.mm. and HIV RNA <50 copies from at least 6 months. When HAART was started CD4+ were >250/cu.mm. 3) Subjects who are under HAART (CDC any stage) with CD4+ >400/cu.mm. and HIV RNA <50 copies from at least 6 months. When HAART was started CD4 were <250/cu.mm. 4) Subjects (any CDC group) never treated with CD4+ >200 and <400/cu.mm. (HIV RNA any value) 5) Subjects who started HAART when CD4+ count was <200/cu.mm. and subsequently have achieved an immune reconstitution. All enrolled subjects are monitored for clinical, biochemical, virological and immunological parameters every 6 months, to ensure that the inclusion criteria would be maintained. Anti-Tat immune response was evaluated upon completion of a 24-months follow-up in selected cohorts of subjects. Detection of anti-Tat antibodies was performed by the technical procedures established in close collaboration with Dr. Barbara Ensoli and co-workers by using a recombinant Tat protein (1-86 aa). Two different Elisa assays were developed in order to obtain high levels of sensitivity (Elisa 1) and specificity (Elisa 2). The humoral immune response against gp120 was evaluated by using the same protocol established for the Tat protein. Four- or three-color cytofluorometric analysis of PBMCs. Plasma HIV-1 RNA levels were determined using the Roche Amplicor HIV-1 Monitor assay.

Results: The prevalence of anti-Tat antibodies was 33% (11/33), 3% (1/33) and 6% (2/33). Asymptomatic patients in A stage accounted for the larger fraction of individuals presenting anti-Tat antibodies at enrollment (53.8%). Quantitative analysis of anti-Tat antibodies production at this time confirmed that stage A individuals had the highest titers of anti-Tat antibodies. The presence of anti-Tat antibodies is associated with significantly lower levels of plasma viremia and the determination of plasma viremia during HAART according to the presence or the absence of anti-Tat antibodies at enrollment, indicated that anti-Tat immune responders had a more effective virological response.

Conclusions: These results support the notion that anti-Tat immunity have a protective role against disease progression and suggest that maintaining or boosting a specific anti-Tat immune response during HAART may contribute to an increased effectiveness of the antiretroviral regimen. To provide a better knowledge of the characteristics of the immune response against HIV-1 Tat protein during the natural course of disease progression, our group in collaboration with Dr. B. Ensoli and co-workers is currently developing studies focused in determining and characterizing both humoral and cellular anti-Tat immune responses in asymptomatic HIV-1 infected patients naive for ARV.

Grant: 45F.30

TAT-TARGETED DELIVERY OF HIV-1 ANTIGENS TO VASCULAR AND LYMPHATIC ENDOTHELIAL CELLS FOR PROTECTIVE IMMUNIZATION: ISOLATION OF ENDOTHELIAL CELLS FROM HUMAN TONSILS AND DETECTION OF CIRCULATING ENDOTHELIAL CELLS IN PERIPHERAL BLOOD

Paolo Monini* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Cecilia Sgadari (*); Giulio Alessandri (*Istituto BESTA*); Clelia Palladino (*); Sara Baccarini (*); Gabriele Moracci (*); Michela Sabbatucci; Gaia Sciaranghella; Emanuela Salvi; Ilaria Bacigalupo (*); Elena Toschi (*); Giovanni Barillari (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Barbara Ensoli (*)

Background: Blood and lymphatic endothelial cells (EC) produce cytokines recruiting immune cells, enhance the antigen presenting and co-stimulatory capacity of transmigrating monocytes, and promote their differentiation in macrophages and dendritic cells (DC). In addition, EC themselves act as antigen presenting cells, as they internalize antigens and, upon activation, they express both MHC-I and MHC-II surface molecules. Further, specialized EC, including brain and liver sinusoid EC, express co-stimulatory molecules, and even EC not expressing CD80 and CD86 can co-stimulate neighbour T cells by inducing co-stimulatory molecules on engaged CD4+T cells. Our studies have shown that extracellular HIV-1 Tat protein is selectively internalised by both DC and EC, and cross-presented with MHC-I. Tat internalisations occurs in both cell types through the interaction of the Tat RGD sequence with $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ integrins (Fanales-Belasio, J Immunol 2002; Barillari, submitted). These data indicate that Tat may be exploited to target EC to elicit efficacious immune responses against HIV.

Methods: Tonsils were processed by mechanical mincing and digestion with collagenase/dispase, and cells selected with beads coated with anti-CD31 antibodies, followed by further selections with anti-CD31-, anti-CD146-, anti-VEGF-R3-, and/or -ULEX-coated beads to select for the different endothelial cell (EC) types. Selected cells were seeded on fibronectin-coated dishes and cultured in the presence of EC growth factors. Cell cultures were characterized for vascular or lymphatic EC markers by IHC, IFA or RT-PCR, and for response to EC growth factors. Circulating endothelial cells (CECs) were identified by 4-color flow cytometry and FACSCalibur analysis in peripheral blood from normal donors and patients with classic Kaposi's sarcoma, where they are increased as compared to healthy individuals (unpublished data). CEC were defined as negative for CD45 (hematopoietic cells), positive for CD31 and CD146, and negative for the progenitor marker CD133.

Results: EC cultures of blood or lymphatic origin (LEC) have been established from human tonsils. The cell populations enriched with antibodies against lymphatic EC markers contain about 70-80% of cells positive for VEGFR-3 and podoplanin, indicating high purification levels. Microvascular EC isolated from the same tonsils are consistently negative for VEGFR-3 but maintain expression of classic EC markers (CD31, CD34, FVIII-RA, endoglin and ULEX). Microvascular EC proliferated in response to bFGF and VEGF-A, whereas proliferative response to bFGF, VEGF-A or VEGF-C and VEGF-D by LEC is under study. CECs were identified in number ranging from few cells per microliter of blood to 15-30 cells in patients with C-KS.

Conclusions: EC of vascular or lymphatic origin have been isolated and characterized for subsequent studies aimed at determining their antigen presenting properties in allogenic lymphocyte reaction. Identification and phenotypic characterization of CEC from peripheral blood will allow developing strategies for their isolation by FACS sorting, for proof of concept that CEC can be expanded *in vitro* and used upon Tat pulsing for priming and boosting of autologous lymphocytes from the same donor.

Grant: 45F/C

MOLECULAR AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NKP46, NKP30, NKG2D, NKP80 AND NKG2C TRIGGERING NK CELL RECEPTORS IN RHESUS AND CYNOMOLGUS MACAQUES: MONITORING OF NK CELL FUNCTION DURING SHIV INFECTION

Manuela Fogli* (*Università degli Studi di Genova*); Roberto Biassoni** (*Istituto G. Gaslini, Genova*); Paola Costa (*) ; Claudia Cantoni (*) ; Gerrit Koopman (*BPRC, RIJSWIJK*); Aurelio Cafaro*** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Barbara Ensoli (***) ; Alessandro Moretta (*) ; Lorenzo Moretta (*Istituto G. Gaslini - Università degli Studi di Genova*); Andrea De Maria (*)

Background: Non-human primate models, including cynomolgus and rhesus macaques, represent an important tool for the development and validation of vaccine models and for the evaluation of immune responses to a considerable list of human pathogens. So far, only a limited number of reagents and information for the study of NK cell function have been available in macaques compared to the knowledge of human NK cell biology. Thus, in view of the still incomplete knowledge of the multiple triggering pathways involved in macaque NK cell function, we performed a detailed analysis of the expression and function of triggering receptors on cynomolgus and rhesus macaque NK cells.

Methods: PBMC were separated from blood samples obtained from a total of 14 *M.fascicularis* and 2 *M.rhesus* animals. Among the cynomolgus animals 6 were chronically infected with SHIV. NK cells were activated and cultured *in vitro* in the presence of rIL-2. A panel of mouse mAbs specific for triggering receptors expressed by NK cell were used. NK Cell cytotoxicity assays were performed to verify NK cell function in a 4hr 51Cr release assay. An RT-PCR based strategy was used to isolate triggering receptor sequences. cDNA were sequenced and transferred in vectors for transient transfection experiments using 293T cells. Cytofluorometric analysis of fresh PBMC and of NK cells was performed by two-step immunofluorescence.

Results: In addition to Nkp30 and Nkp46, both macaque species express at least two additional surface antigens that are readily recognized by mAbs specific for human Nkp80 and NKG2D NK cell triggering receptors. On the contrary, the available human-specific mAbs reacting with 2B4 (CD244) and NTB-A (pp35 and MA127, respectively) did not show any reactivity with PBMC derived from both macaque species. Using cytotoxicity assays employing tumor cells as NK cell targets, Nkp80 and NKG2D on macaque NK cells are functional and trigger NK cell cytotoxicity. cDNA cloning/sequencing and transient transfections were used to identify and characterize Nkp80, NKG2D, CD94/NKG2C and CD94/NKG2A in *M.fascicularis* and *M.mulatta* as well as the signal transducing polypeptide DAP-10. Both *M.fascicularis* and *M.mulatta* NK cells express functional Nkp80, NKG2D and NKG2C molecules, which displayed high degree of sequence homology with their human counterpart. Analysis of NK cells in a small group of SHIV-infected *M.fascicularis* revealed reduced surface expression of selected NK cell triggering receptors associated with a decreased NK cell function only in some animals. Overall, surface density of NCRs on peripheral blood cells and their triggering function on NK cell populations derived *in vitro* were not decreased compared to uninfected animals, while NKG2D was decreased.

Conclusions: NK cells in cynomolgus and rhesus macaques have a partially overlapping array of triggering receptors compared to human NK cells. Thus, their monitoring is possible and could provide a valuable tool for assessing NK cell function during experimental infections and to explore possible differences in immune correlates of protection in humans compared to Cynomolgus and Rhesus macaques undergoing different vaccination strategies. Differences between human and macaque NK cell phenotype and function after retrovirus infection need further evaluation.

Grant: 45F.12

EVALUATION OF DENDRITIC CELL PHENOTYPE AND FUNCTIONAL ACTIVITY IN A NONHUMAN PRIMATE MODEL

Sonia Moretti* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Aurelio Cafaro (*); Emanuele Fanales Belasio (*); Maria Rosaria Pavone Cossut (*); Piergiorgio Pupino Carbonelli (*); Barbara Ensoli (*)

Background: Dendritic cells (DCs) are the most potent of all antigen-presenting cells. DCs are found in blood and almost all other tissues where, in their immature state, they take up and process antigens from their environment with high efficiency for the initiation and regulation of innate and adaptive immune responses. Changes in number, types and functional activity of DC subtypes could contribute to progressive HIV-1 and SIV-associated immunodeficiency because of impairment of antigen processing and presentation. Comparative cross-species studies of DC subsets are important in our understanding of DC immunobiology and their potential for clinical application. Nonhuman primates (NHP) exhibit substantial immunologic similarity to humans. Thus, characterization of NHP DC subsets and the ability to manipulate, using suitable candidate vaccine antigens, their production *in vivo* are important steps toward the therapeutic application of DCs in clinically relevant models and in vaccine development.

Methods: Monocyte-derived DCs were generated from CD14⁺ monocytes of healthy macaques (*Macaca fascicularis*) isolated using the anti-human CD14 MACS system, a specific antibody-based magnetic isolation system and cultured in the presence of IL-4 and GM-CSF for 7 days. Morphological and phenotypical characterization of MDDC were performed by light microscopy and flow cytometry. For the Ag-specific presentation assay MDDC were incubated for 18 h with active Tat protein or reconstitution buffer and then cultured with autologous PBL. After 1 to 2 weeks, [³H]thymidine was added for 16 h, samples were harvested, and radioactivity uptake was measured.

Results: DC cultured from CD14⁺ peripheral blood monocytes of *Macaca fascicularis* had characteristic dendritic morphology, retained low expression of CD14, were negative for the mature DC marker CD83, and expressed moderate levels of costimulatory molecules CD80, CD86, and CD40 and high levels of MHC class I and class II. The effect of Tat protein on MDDC maturation was evaluated by flow cytometry. Experimental data indicated that Tat induces a slight enhancement of the expression of MHC, CD83 and costimulatory molecules (CD40, CD80 and CD86). Reconstitution buffer did not change the expression levels of the molecules analyzed. To evaluate the effect of Tat on the Ag-presenting capacity of MDDC, cells were exposed to the Tat protein or reconstitution buffer and cultured with autologous PBL. The proliferative response of PBL was significantly enhanced by MDDC pulsed with Tat. In contrast, no enhancement of autologous lymphocyte proliferation was observed by treatment of MDDC with reconstitution buffer.

Conclusions: The macaque-simian immunodeficiency virus (SIV) system is one of the best animal models available to study the role of dendritic cells (DCs) in transmission and pathogenesis of HIV, as well as to test DC-based vaccine and therapeutic strategies. We have obtained dendritic cell cultures from *Macaca fascicularis* PBMC, according to protocols established for human MDDC, and demonstrated that these cells have all the characteristics of DC. The responsiveness of macaque monocyte-derived DCs to the Tat protein, an important candidate vaccine antigen, was examined. Although in general macaque DCs exhibit weaker responses to maturation stimuli, Tat promoted the maturation of DC and increased DC presentation function, thus representing a particularly potent and useful stimulus for the generation of efficacious immunostimulatory macaque DCs.

Grant: 45F/C

USE OF RETROVIRAL VECTORS FOR THE ANALYSIS OF SHIV-SPECIFIC CD8 T CELL RESPONSES

Donatella R. M. Negri* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Viviana Buffa (*); Pasqualina Leone (*); Ilaria Bacigalupo (*); Roberta Bona (*); Martina Borghi (*); Stefano Indraccolo (*Università degli Studi di Padova*); Barbara Ensoli (*); Andrea Cara (*)

Background: Accumulating evidence suggests that CD8 T cell responses and particularly cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity play a critical role in controlling SHIV replication in infected macaques as well as HIV in humans. For these reasons, they represent a key correlate of protection or non-progression both after vaccination and upon infection. Thus, the opportunity to measure the ability of CD8 T cells to lyse target cells remains an important tool. To this aim, recombinant vaccinia viruses (rVV) are widely used to deliver viral antigens to stimulator/target cells in chromium release and in IFN γ -ELISPOT assays. However, the use of vaccinia virus could imply different problems such as safety and expansion of non antigen specific effector cells. For these reasons, we decided to generate autologous BLCL stably transduced with retroviral vectors expressing SHIV proteins in order to measure CTL activity in cynomolgus monkeys during vaccination and infection protocols.

Methods: Simian B lymphoblastoid cell lines (BLCL) were obtained by transforming peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from cynomolgus monkeys with Herpesvirus papio. To express the SIV-Gag protein (SIVmac239 p55Gag), two different retroviral vectors, pBabe-SIVGag.CTE and pFB-SIVGag.CTE, were produced by cloning the full length SIV-Gag coding sequence linked to a cytoplasmic transporter element (CTE) for Rev/RRE independent nuclear export into the retroviral vectors pBabe-Puro and pFB-Neo. Retroviral vector expressing the HIV-1 Env was obtained by cloning gp160 full length envelope gene into the pFB-Neo and pBAF-Neo retroviral vectors. The resulting retroviral vectors were then transfected into the Phoenix packaging cell line along with a VSV-G expressing plasmid. The retroviral vector containing supernatants were used to infect BLCL. Transduction of BLCLs was obtained by selection using either puromycin or G418 and always kept under selection during the experiments. Production of transduced SHIV proteins was evaluated by using ELISA and Western blot assays. Analysis of SHIV specific CD8 responses in the infected monkeys was performed by using standard Chromium release assay and IFN γ ELISPOT, after stimulation of PBMC with autologous transduced BLCL. The same BLCL were used as target cells. We compared the efficiency of this new method with that one based on the use of rVV infected BLCL.

Results: Continuous expression of Gag and Env proteins was detected in stably transduced BLCL, which induced Gag- or Env-specific T cell responses, as measured by both IFN γ ELISPOT and chromium release assays, upon *in vitro* stimulation of PBMC from the SHIV89.6P infected monkeys. Moreover, induction of Gag specific CTL by using BLCL transduced with retroviral vector expressing the SIV-Gag protein was more efficient and specific as compared to that obtained by using BLCL infected with a recombinant Vaccinia Virus (rVV) encoding for the same antigen. Assays on purified CD4⁺ and CD8⁺ T cells indicated that both populations specifically produced IFN γ , but only the CD8⁺ T cells mediated Gag and Env specific cytotoxicity, indicating preferential expansion of these effector cells.

Conclusions: The use of transduced BLCL stably expressing SHIV antigens for inducing *in vitro* expansion of SHIV specific CD8 T cells provides a new methodology more efficient and safer when compared to others based on the use of rVV infected BLCL. This technique will allow the analysis of correlates of protection during vaccination and in protected monkeys upon challenge with SHIV89.6P.

Grant: 45F/C

ANTIVIRAL EFFICACY AND RESISTANCE MUTATIONS TO ENFUVIRTIDE IN HIV-1 GP-41 SEQUENCES FROM PLASMA AND SEMINAL FLUID

Carlo Federico Perno (*INMI L. Spallanzani, Roma - Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Roberta D'Arrigo* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Valentina Svicher (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*); Pasquale Narciso (*); Giuseppina Liuzzi (*); Sergio Lo Caputo** (*Clinica delle Malattie Infettive, Firenze*); Rita Bellagamba (*); Patrizio De Longis (*); Ubaldo Visco Comandini (*); Francesco Mazzotta (**); Andrea Antinori (*)

Background: The characteristics of env proteins play a crucial role in the evolution of HIV-related disease. While the majority of studies have been concentrated upon gp120, few data are available regarding the relationship between the variability of gp41 and the evolution of the disease. Whether such variability is function only of immune pressure, or also of other parameters, such as antiviral therapy, remains not investigated. For this reason, we developed a system to sequence the entire gp41 in patients undergoing treatment with an inhibitor of gp41, enfuvirtide, able to select for mutated proteins with structural characteristics potentially different than the native protein.

Methods: Home-made genotypic assay able to assess HIV-1 env gene with a good sensitivity (<500 copies/ml) was settled. gp41-region of all patients was successfully sequenced. Aminoacids of gp41 sequence known to change under enfuvirtide-treatment were analysed. HIV-subtyping was performed by phylogenetic analysys. Wilcoxon-tests were used to assess the efficacy of enfuvirtide-based regimen.

Results: The introduction of enfuvirtide in the pre-existing therapy was associated with a significant viremia decrease and CD4 increase ($p=0.031$ and 0.004 , respectively) beginning from the 4th week of therapy and lasting at least up to 24 weeks ($p=0.015$ and 0.00024 , respectively) suggesting a good efficacy of enfuvirtide-treatment. Before treatment, plasma HIV-1 gp41 were devoided of enfuvirtide-resistance mutations, except for rare polymorphisms at positions 39 (1 pt) and 42 (2 pts), that do not reduce sensitivity to enfuvirtide. After a 4-to-92 weeks follow-up, substitutions in gp41 aa36-45 were observed in 82.7% patients. Of them, enfuvirtide-resistance mutations were detected in 44.9% of patients showing also a virologic failure. V38A was the most observed mutation (31%), followed by N43D (6.9%), G36D (3.4%), N42T (3.4%). In 5 patients, associations of mutations were observed (V38A+G36V+N42D; V38A+N42D; N42T+L44M; N43D+N42Q; N43D+L44M). Interestingly, enfuvirtide-based treatment induced (in 4/29 patients) mutations in four conserved gp41-N-linked glycosilation sites, thus causing the loss of glycosilation at such sites. In 2 patients whose coupled plasma-seminal fluids were available, no mutations were detected at base-line in seminal fluid sequence, while in a single patient (during enfuvirtide-treatment) Q40H+L45M mutations were observed both in plasma and seminal fluid.

Conclusions: Rapid and remarkable variability of selected areas of gp41 have been detected in patients undergoing treatment with enfuvirtide. The modification of glycosilation sites may play a relevant role in antigen recognition, and therefore in the development of immune response against such protein. The ongoing studies will be dedicated to the evaluation of the immunological aspects of these findings.

Grant: 45F.31

DEVELOPMENT AND *IN VITRO* TESTING OF VECTOR CONSTRUCTS FOR A DNA/TRANSDUCE AUTOLOGOUS LYMPHOCYTE PRIME-BOOSTING VACCINATION STRATEGY

Mauro Pistello* (*Centro Retrovirus e Sezione Virologia, Università degli Studi di Pisa*); Francesca Bonci (*); Elisa Zabogli (*); Paola Mazzetti (*); Giulia Freer (*); Donatella Matteucci (*); Mauro Bendinelli (*)

Background: Suboptimal immunogenicity and/or inadequate presentation are believed to represent important factors in HIV and FIV vaccination failures. Gene delivery approaches targeting APC and expressing immunogens in native conformation might overcome these obstacles. To better target the APC, we conceived a prime-boost vaccine strategy, in which priming consists of immunizing with a plasmid co-expressing Env and GM-CSF and boosting consists of autologous lymphocytes expressing Env and gamma-IFN. GM-CSF was chosen as an adjuvant for priming due to its recognized ability to induce dendritic cell (DC) differentiation and proliferation. We are currently evaluating the feasibility of this approach in the FIV model.

Methods: Env was obtained from a primary lymphotropic FIV isolate and feline GM-CSF from alveolar macrophages cDNA. Both Env and GM-CSF were cloned into the pVIVO plasmid and under SV40 and CMV promoters, respectively (p-Env-GMCSF). Env production was monitored by WB and flow cytometry and GM-CSF bioactivity by a cell proliferation assay using GM-CSF-dependent human erythroblastoid TF-1 cells. An FIV-derived vector carrying env and gamma-IFN (v-env-gIFN) was used for transducing feline lymphocytes and DC. Virions containing v-env-gIFN were produced in feline fibroblast CrFK or human epithelial 293T cells with a packaging construct expressing FIV Gag-Pol and Env provided by the vector or p-Env-GMCSF. Pseudovirions carrying VSV-G or Env of the endogenous feline retrovirus RD114 were also produced. Transduction efficiency of these virions was evaluated by flow cytometry using a vector with green fluorescent protein (GFP) in place of gamma-IFN. Env and gamma-IFN expression was evaluated by WB and flow cytometry.

Results: p-Env-GMCSF-transfected CrFK and 293T cells produced Env and GM-CSF for up to 2 weeks, and GM-CSF bioactivity was superimposable to that of control human GM-CSF. Transduction efficiency greatly depended on the envelope protein. VSV-G pseudovirions were the most effective in transducing CrFK and 293T cells (90% of both expressed GFP for over 4 weeks) and feline monocyte-derived DC (50% GFP expression) but were slightly cytotoxic for the feline T-lymphoid cell line MBM and primary lymphocytes. On the contrary, FIV Env virions performed best in MBM and primary lymphocytes (30% GFP-positive after prolonged cultivation) and transduced a small fraction of DC (10% GFP expression) but did not transduce CrFK and 293T cells. Similarly, 1/3 of the MBM and primary lymphocytes transduced with v-env-gIFN were found to be Env and gIFN positive.

Conclusions: These results demonstrate that both candidate priming and boosting constructs produce immunogen and immunoadjuvants and are, therefore, suitable for *in vivo* administration. Currently, specific pathogen-free cats are being primed with p-Env-GMCSF. Once the immunizing protocol will be completed, the animals will be challenged with fully virulent *ex vivo* FIV to assess the potential of the strategy. The outcome may be of guidance in developing anti-HIV vaccines.

Grant: 45F.32

GAMMA/DELTA T CELL CROSSTALK WITH DENDRITIC CELLS AND ADJUVANT APPLICATIONS OF NON-PEPTIDIC BACTERIAL PRODUCTS

Fabrizio Poccia* (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Rita Casetti (*); Angelo Martino (*); Delia Goletti (*); Douglas Horejsh (*); Hélène Sicard (*Innate-Pharma, Marseilles*); Jean Jacques Fournié (*CNRS, INSERM395, Toulouse*)

Background: The reciprocal interactions of dendritic cells (DCs) and NK cells are well-known. Thus, we extended this model to DCs and gamma/delta T cells, looking for novel therapeutic applications. Most circulating gamma/delta T cells express a Vgamma9/Vdelta2 TCR able to interact with non-peptidic molecular patterns derived from different microorganisms and abnormal metabolic routes. Vgamma9/Vdelta2 T cells share both NK-like and effector/memory T cell features, thus uniquely interacting with DCs. Accordingly, the specific aims of this project are: a) to understand the molecular mechanisms of the gamma/delta T cell crosstalk with DCs; b) to select non-peptidic compounds targeting gamma/delta T cells for vaccine subunits and c) to develop models for testing gamma/delta T cell-mediated vaccine adjuvancy.

Methods: Monocytes were separated by positive selection using anti-CD14 magnetic beads and cultured with GM-CSF + IL-4 to generate immature DC (imDCs). Gamma/delta T-cells were purified using magnetic beads and co-cultured with autologous imDCs in the presence or absence non-peptidic bacterial antigens (isopentenyl pyrophosphate and/or lipopolysaccharide). The expression of activation and differentiation markers was analysed by flow cytometry using specific mAbs. Cytokine production was determined by ELISA and cell proliferation with CFSE. A prime/boost study of immunogenicity is ongoing in cynomolgus monkeys (n=16) receiving i.m. injections of a formulated "Hybrid-1" vaccine in the presence (n=8) or absence (n=8) of "Picostim", a second generation gamma/delta stimulatory drug.

Results: Co-culture of immature DCs with activated Vgamma9/Vdelta2 T cells led to a significant up-regulation of co-stimulatory (CD40, CD80, CD83, CD86) and MHC molecules and the acquisition of features of mature DCs. Activated gamma/delta T cells were able to induce and up-regulate the expression of chemokine receptors (such as CCR7) on DCs. Thus, gamma/delta T cells may complement the migratory activity of DC to lymphoid organs and the consequent T-cell antigen presentation. Similarly to the NK-derived signals, DCs activation was mostly mediated by TNF-alpha and IFN-gamma secreted by gamma/delta T cells. Moreover, the CD86 cell-contact interaction resulted in reciprocal activation, increasing gamma/delta T cell proliferation and pro-inflammatory cytokine production. The functional interaction between DCs and gamma/delta T cells in the presence of bacterial products such as lipopolysaccharide (LPS) increased the functional maturation of DCs augmenting Th1 immune response in naïve CD4 T cells. *In vivo*, a pilot study is ongoing to document the adjuvant effect of the second generation pyrophosphomonoester drug "picostim" in a macaque model.

Conclusions: The complex interplay between DC and gamma/delta T cells represent a network of paracrine and cell-contact interactions which may boost the local proinflammatory response and more rapidly trigger the adaptive immunity. Interestingly, the activity of Vgamma9/Vdelta2 T cells *in vitro* and *in vivo* can be stimulated by many non-peptidic molecules including nitrogen-containing bisphosphonates (frequently used in the treatment of bone demineralization disorders) and pyrophosphomonoester drugs (currently being tested in Phase I cancer trials). The relatively low *in vivo* toxicity of many of these drugs makes possible novel strategies for boosting vaccine immunity.

Grant: 45F.33

FOLLOW-UP IMMUNOVIROLOGICO DELLA COORTE “MILANO” DI LTNP (WP2) - ASPETTI DI ADIUVANZA VACCINALE DI PTX-B, B-OLIGOMERO DELLA TOSSINA DELLA PERTOSSE (WP3)

Silvia Grezzi* (*IRCCS S. Raffaele, Milano*); Massimo Alfano (*); Giulia Morsica (*); Elena Santagostino (*Università degli Studi di Milano*); Marco Cusini (*IRCCS Ospedale Maggiore*); Adriano Lazzarin (*); Guido Poli (*)

Background: La Coorte “Milano” è formata da 47 LTNP nel 1994. PTX-B può rappresentare un adiuvante “ideale” nello sviluppo di un vaccino anti-HIV per capacità d’inibire la replicazione virale, capacità di stimolare le risposte immunitarie e dimostrata capacità d’adiuvanza vaccinale e disponibilità di una versione geneticamente modificata (PT-9K/129G), GMP-grade.

Metodi: Gli individui LTNP sono seguiti ogni 6 mesi. Campioni di sangue venoso periferico vengono prelevati e separati nella componente plasmatica e in PBMC ed entrambi vengono aliquotati e preservati a -80°C e in azoto liquido. L’isolamento virale viene eseguito su PBMC o su PBMC depletati di cellule CD8+ mediante co-coltivazione con blasti T cellulari allogenici o coltura diretta in presenza di PHA e IL-2. Lo studio delle caratteristiche d’immunoattivazione di linfociti T resting da parte di PTX-B è stato eseguito sia su cellule di sangue periferico che su istocolture linfoidi. L’analisi della secrezione di citochine e chemochine è stata eseguita sia mediante ELISA classico che multiparametrico (SearchLight).

Risultati: (WP2). Il follow-up della coorte ha dimostrato che, dopo 5 anni, ca. la metà dei soggetti aveva perduto le caratteristiche di LTNP in quanto: a. è stata dimostrata una discesa del n. di CD4 <500 cellule/ μl in >2 determinazioni (30 gg l’una dall’altra), b. è stata iniziata una ART indipendentemente dai livelli di CD4. Questi individui sono stati riclassificati come “late progressors (LP)” e sono stati studiati per lo meno fino al momento dell’inizio della ART. Gli studi in corso su questa coorte riguardano principalmente la risposta anticorpale alla proteina Tat (in collaborazione con V. Fiorelli e B. Ensoli dell’ISS), a p17 Gag (in collaborazione con A. Caruso dell’Università di Brescia) e anti-CCR5 (in collaborazione con L. Lopalco dell’IRCCS San Raffaele di Milano). Abbiamo inoltre dimostrato che l’isolamento virale positivo (ISO+) e la presenza di ceppi virali SI/X4 sono predittori di perdita della condizione LTNP indipendenti dai livelli di CD4 e viremia. (WP3). PTX-B e PT-9K/129G sono in grado di stimolare l’attivazione e proliferazione cellulare T linfocitaria (CD4 $>$ CD8) disaccoppiandole dalla replicazione di HIV, come abbiamo dimostrato recentemente in istocolture linfoidi (M. Alfano *et al.*, AIDS, 2005, in stampa). Inoltre abbiamo caratterizzato il pattern di citochine e chemochine rilasciate da PBMC resting mantenuti in IL-2 e stimolati con PTX-B o PHA. Sebbene molte molecole sono attivate in modo comparabile dai due mitogeni, PHA induce livelli di IL-1b, IL-6, IL-8 ed MCP-1 (tutte molecole indipendentemente correlate ad aumentata replicazione di HIV in linfociti T o macrofagi) molto più alti di PTX-B.

Conclusioni: Gli individui LTNP rappresentano una preziosa fonte d’informazioni immunologiche e virologiche che dovrebbe essere maggiormente studiata in un contesto di sviluppo di un vaccino efficace nella prevenzione e/o terapia dell’infezione da HIV. La risposta Ab contro proteine strutturali (p17) e regolatorie (Tat) di HIV gioca un ruolo sicuramente rilevante nel mantenimento o perdita della condizione LTNP e, per estensione, nella popolazione generale sieropositiva. PTX-B e PT-9K/129G rappresentano ideali molecole adiuvanti per lo sviluppo di un vaccino anti-HIV in base alle loro caratteristiche di attivazione linfocitaria e d’inibizione della replicazione virale.

Contributo: 45F.34

I) PREPARATORY STUDIES (LABORATORY AND CLINICAL SETTING) FOR PREVENTIVE AND THERAPEUTIC CLINICAL TRIALS IN ADULTS
II) EPIDEMIOLOGICAL, VIROLOGICAL AND CROSS-CLADE IMMUNOLOGICAL (FEASIBILITY) FIELD STUDIES FOR COHORT PREPARATION TO PHASE II/III VACCINE TRIALS IN DEVELOPING COUNTRIES

B. Suligoi* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); D. Bernasconi (*) ; C. Kyoto** (*JCRC, Kampala, Uganda*); O. Tchangmena (**); S. Buttò (*) ; G. Rezza (*)

Background: Background: In order to plan phase II/III trials of candidate HIV vaccines, it is of great importance to conduct preparatory and feasibility studies. These studies consist of an epidemiological and a psycho-social component. The epidemiological component is represented by the assessment of HIV prevalence and incidence in the area where clinical trials will be conducted, and the identification of HIV circulating strains. The psycho-social component is represented by studies assessing willingness to participate at clinical trials of HIV vaccines. Objectives: Aim of this study is to estimate incidence of HIV infection in several African countries affected by different HIV circulating strains.

Methods: To estimate HIV incidence from cross-sectional studies, we used the avidity index method. However, since this method has been validated only on HIV-1 subtype B, a collaborative study was conducted with the JCRC of Kampala, Uganda, in order to validate our method on HIV-1 subtypes other than B. Serum samples from a series of other countries (i.e., South Africa, Cameroon, etc) were also collected to estimate HIV incidence and identify circulating subtypes and recombinant forms.

Results: The analysis of the results is still in progress. However, the avidity index method appears to efficiently identify recent infections due to HIV-1 strains other than B. The cocirculation of several different subtypes and recombinant forms was confirmed in the areas involved in the study.

Conclusions: We propose a new method to estimate HIV incidence using a unique serum sample collected during cross-sectional studies. This method can be usefully applied also in the African context, where HIV-1 subtypes other than B cocirculate.

Grant: 45F/H

VACCINE DEVELOPMENT AND SELECTION (SAFETY AND IMMUNOGENECITY IN SUITABLE ANIMAL MODELS)

Marco Schiamone* (*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*); Camillo Palmieri (*); Franca M. Tuccillo (*Istituto Nazionale Tumori "G. Pascale", Napoli*); Emanuela Di Salle (*); Cristina Falcone** (*Università degli Studi di Catanzaro*); Enrico Iaccino (**); Ileana Quinto (*); Giuseppe Scala (*)

Background: To date, efforts to develop a truly prophylactic HIV-1 vaccine have been hindered by difficulty in identifying immunogens that elicit broadly neutralizing antibodies. This lack of significant cross-protection raises further concerns on the capacity of classical Env-based vaccines to afford substantial protection against field isolates. Indeed, current unmodified gp120 or gp140 envelope-based vaccines in human subjects have shown little or no protection from heterologous HIV-1 isolates such as would be encountered in the field.

Methods: The aim of this project is to select peptide epitopes that mimic neutralization sensitive domains of HIV-1 envelope and may function as candidate HIV-1 vaccines. This objective will be achieved by two complementary strategies: A. Screening of Random Peptide Libraries (RPLs) with MAbs that neutralise primary HIV-1 isolates assigned to distinct clades; B. Designing of 30-40 amino acid peptides that mimic discontinuous regions of gp120 and gp41 that are sensitive to neutralization by antibodies and are conserved among HIV strains of distinct clades. These include the bridging sheet and the pre-fusogenic harpin loop of gp41.

Results: A. We have screened two distinct RPL with the neutralizing MAbs 2F5, 4A10 and have selected pools of phage-displayed peptides that interact specifically with the cognate MAb used in the selection procedures and by antibodies from HIV-infected subjects. These epitopes are being tested for immunogenicity in mice. B. By using a structural biology analysis of the HIV-1 envelope domain that interacts with the chemokine coreceptor, we have devised a pool of 30-40 mer peptides that mimic the Beta sheet structure of gp120. These peptides bind selectively to serum antibodies from a large array of HIV-infected subjects and of rhesus macaques infected with SHIVs, suggesting that they are antigenic mimotopes of the corresponding envelope Bridging sheet. Selected sequences have been fused to distinct protein carriers and used to immunize mice. These ongoing studies indicate that immunized mice elicit peptide-specific antibodies that cross react with an oligomeric gp140.

Conclusions: These data support the mimotope strategy of using peptide structures to elicit envelope-specific antibodies.

Grant: 45F.37

ROLE OF HIV-1 PHENOTYPE AND NEUTRALIZING ANTIBODY RESPONSE IN SIBLING WITH DIFFERENT DISEASE PROGRESSION

Chiara Ripamonti* (*DIBIT, Milano*); Anna Nordqvist** (*Lund University*); Ingrid Karlsson (**); Angela Pastore (*); Mariangela Cavarelli (*); Anna Plebani (*Clinica De Marchi*); Eva Maria Fenyo (**); Gabriella Scarlatti (*)

Background: The evolution of disease in perinatally infected children is characterized by two different patterns. In the first, one quarter of children have rapidly downhill course of disease and developing features characteristic of AIDS within the first year of life. In the second, children have a slower course and show no signs or symptoms of AIDS for some years. Many factors are likely to alter the course of disease in children and the knowledge of these factors could be important to planning interventions. Timing of transmission, immunologic, genetic and viral factors were suggested to play a role in disease progression. We studied in two HIV-1 infected siblings with different disease progression the humoral immune response and the virus variability with a novel technique.

Methods: Chimeric receptors were obtained by replacing successively larger parts of CCR5 with corresponding parts of CXCR4 and transfected into U87.CD4 cells. The infected cultures were tested for p24 Ag production at 7 days and inspection for syncytium formation was performed daily. Serum was tested for neutralizing capacity in PBMC or GHOST cells. In the PBMC assay, 7 days after infection samples were analyzed for the presence of HIV-1 p24 Ag. In the GHOST(3) cells assay, 3 days after infection cultures were evaluated at the fluorescent microscope for syncytium formation.

Results: The first born, sibling A was a delayed progressor, whereas sibling B was a fast progressor. Sibling B was treated since the age of 4 months with ATZ and 3TC and only after study stop with HAART. The study of the chemokine receptor usage of viral isolates showed that both siblings were infected with R5 virus, which persisted throughout follow-up. Thus, we studied the evolution of children's R5 isolates testing the isolates on the U87.CD4 cells expressing the chimeric CCR5/CXCR4 receptors. The isolates of both siblings were able to use the chimeric receptors during the follow-up, but those of child A acquired this ability at 40 months whereas those of child B already at 13 months. To further characterize the viral isolates we tested their viral titers in U87.CD4 expressing the wild type CCR5. We showed that pure R5 viruses grew to lower titers than those viruses, which had acquired chimeric receptor usage, suggesting a higher affinity for CCR5 of the latter ones. The study of the viral sensitivity to RANTES showed that most of the virus isolates of child B had higher sensitivity than those of child A. The children's sera were tested for neutralizing response against their autologous isolates obtained both simultaneously and during follow-up. Both siblings developed a cross-neutralizing response towards early and late isolates, which persisted during follow-up. Tests performed with purified IgG confirmed results obtained with whole serum, thus showing that neutralization was not due to other factors than antibody. The comparison of 2 neutralization assays, i.e. PBMC or Ghost- based assays, showed similar results although suggesting a higher sensitivity of the cell line based one.

Conclusions: Our data indicate the phenotypic change seems to play a relevant role in the pathogenic process. The emergence of R5 variant virus able to use more efficiently CCR5 coreceptor and the early sensitivity to RANTES could influence the rate of disease progression. In contrast, the presence of cross-neutralizing response does not support a role for NAb in protection from disease.

Grant: 45F.38

DOWNREGULATION OF NATURAL KILLER ACTIVITY BY THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE-1 TAT PROTEIN IS INDEPENDENT FROM THE EXPRESSION OF KILLER INHIBITORY RECEPTORS FOR HLA-C AND IS ABROGATED BY ANTI-TAT SPECIFIC ANTIBODIES

Maria Caterina Siriani* (*Dip. di Medicina Clinica, Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Fabio Libi (*); Massimo Campagna (*); Donato Scaramuzzi (*); Valeria Fiorelli** (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Barbara Collacchi (**); Fabrizio Ensoli (*IRCCS S. Gallicano, Roma*); Barbara Ensoli (**)

Background: Natural killer (NK) cells, a first-line defense to tumor and viral spreading, are regulated by an interplay between activation and inhibition signals delivered by surface receptors, including the killer immunoglobulin-like receptors (KIR) for MHC-class I molecules. The influence of HIV infection on NK cells is still poorly understood. Our study focuses on the interaction between the HIV Tat protein, an early regulatory protein essential for viral replication, infectivity and AIDS pathogenesis, and NK cell maturation, survival and functional activities.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from normal blood donors (NBD) were isolated and NK cells enriched by negative selection [antibody column-based purification (Stem Cell Technologies)]. Cytolytic activity was assessed by the ⁵¹Chromium-release assay using the K562 cell line. Flow cytometry analysis of CD8, CD3, CD56, KIR2DL1 and KIR2DL2/3 [all from B-D, except anti-KIR2DL1 (CD158a) and anti-KIR2DL2/3 (CD158b), from Immunotech] was performed by either quadruple or triple IFL using a FACSCalibur (B-D). PBMC or NK cells (1.000.000/well) were cultured for 3 to 7 days in the presence of Tat (10, 100 pg/ml), rIL-15 (2.5, 5 and 10 ng/ml; R&D Systems, MN) and IL-15 plus Tat, at the above indicated final concentrations. The Tat protein (1-86 aa from HTLV-IIIb strain), was purified by heparin-affinity chromatography and high performance liquid chromatography, lyophilized and stored at -80°C, in the dark. Affinity-purified rabbit polyclonal anti-Tat IgG (BR101) were used in neutralization experiments.

Results: A dose-response curve (from 10 pg/ml to 10 ng/ml), generated to assess the effect of Tat on NK cell activity, gave a statistically significant ($p < 0.001$) reduction of the NK activity from both PBMC and NK cells. The effects were dose-dependent, evident at concentrations from 100 pg/ml to 10 ng/ml, and were neutralized by the addition of polyclonal anti-Tat antibodies (final dilution 1:100) to the cell cultures. Flow cytometry revealed that Tat did not alter KIR expression by NK cells. To assess whether the reduced lytic function might depend upon interference with soluble factors such as IL-15, which acts in promoting NK cell survival and maturation, PBMC and NK cells were cultured in the presence of Tat, IL-15 and a combination of Tat plus IL-15. Tat enhanced the effect of IL-15 on the survival of CD56bright+ cells (bearing CD26) at both 3 and 7 days of culture, although Tat alone had no direct effects on these parameters.

Conclusions: NK activity is reduced by the addition of exogenous Tat. This effect is independent from an up-regulation of KIR on either PBMC or purified NK cells. However, Tat exerted a positive regulation on IL-15-mediated increase of CD56bright+ cells, and this might indirectly contribute in diverting the NK response toward a prevalent cytokine-secreting activity. Since polyclonal antibodies to Tat neutralized its inhibitory effect on NK cell lytic functions, these data also suggest that the induction of a strong humoral immune response to Tat may play a part in controlling the deleterious effects of HIV infection on key anti-viral immune functions.

Grant: 45F.39

AZIONE CONCERTATA ITALIANA PER LO SVILUPPO DI UN VACCINO CONTRO HIV/AIDS

Giuseppe Nardini* (*Azienda Ospedaliera "D. Cotugno", Napoli*); Loredana Cafaro (*); Alberto Vito (*); Fabrizio Starace (*)

Background: Identification of psychosocial factors and motivations that drive participation or non-participation in vaccine clinical trials represents a key element in the planning and implementation of experimental studies. As a matter of fact, the underestimation of participants' information and motivation may lead to non-adherence or to drop-out from the trial. Moreover, the assessment of psychological impact of vaccine trial participation allows the improvement of experimental procedures quality (by means of motivation enhancement and psychological support).

Objectives: 1. Definition of a behavioural and psychological assessment package

2. Assessment of psychosocial and behavioural aspects in clinical trials participants

3. Applicability, acceptability and effectiveness evaluation of the behavioural and psychological assessment package

4. Adaptation of the assessment package according to results of field trials and experts input.

Methods: Description of the work as specific activities: 1. Updated literature review on psychosocial and behavioural aspects related to clinical experimentation of vaccine candidates; 2. inventory of measurement tools; 3. development of assessment package; 4. development of guidance for local use; 5. field trial application of the developed package; 6. evaluation of field study results for applicability, acceptability and effectiveness of the assessment package tools.

Results: Report of the updated literature review on psychosocial and behavioural aspects related to clinical experimentation of a vaccine candidate, inventory of measurement tools (6th month).

Conclusions: Definition of a behavioural and psychological assessment package to be adopted during the clinical experimentation of a vaccine candidate allows the research staff a more comprehensive understanding of psychosocial and motivational parameters which may significantly influence participation in the trial. Careful assessment of these aspects will help to improve quality and effectiveness of recruitment and experimental procedures.

Grant: 45F.40

MICOFENOLATO MOFETIL ASSOCIATO A SINGOLA INTERRUZIONE DI TERAPIA IN SOGGETTI TRATTATI DURANTE INFEZIONE PRIMARIA DA HIV

G. Tambussi* (*IRCCS S. Raffaele, Milano*); C. Tassan Din (*) ; A. Lazzarin (*Università Vita-salute, Milano*)

Background: L'attiva stimolazione del sistema immunitario riscontrabile durante la PHI con il conseguente danno mediato dai linfociti T, gioca un ruolo importante nella patogenesi dell'infezione da HIV. In questo contesto l'uso di immunomodulanti è presumibile possa avere una parte importante. Un trattamento precoce durante la PHI, composto da immunomodulanti ed HAART, potrebbe essere la chiave per consentire un controllo completo o parzialmente completo dell'infezione anche in assenza di terapie antivirali di mantenimento a lungo termine. Il micofenolato mofetil (MMF, CellCept), ampiamente conosciuto e usato nel trapianto di rene, è in grado di inibire, reversibilmente, la proliferazione di T e B linfociti bloccando la sintesi de novo delle purine (inibizione di inosina monofosfato deidrogenasi). Questo studio pilota, ha come obiettivo principale confrontare gli effetti di STI in associazione a CellCept sui parametri virologici e immunologici.

Metodi: In linea con la tempistica indicata dalle diverse task per il primo anno di studio, il protocollo clinico nucleo del progetto è stato presentato al comitato etico dell'Ospedale San Raffaele, ed ha ricevuto l'approvazione come studio spontaneo interno. In parallelo alle procedure regolatorie, è stato approntato in data base clinico per la successiva elaborazione dei dati. Su un template esistente di cartella clinica computerizzata, è stata definita una scheda di raccolta dati (CRF) specifica per lo studio, al fine di poter riversare direttamente i dati relativi ai parametri clinici e di laboratorio nel data base per la successiva analisi statistica.

Risultati: Il pre-screening dei pazienti afferenti alla Clinica delle Malattie Infettive IRCCS San Raffaele di Milano, effettuato interrogando il data base della clinica, ha consentito di individuare 29 soggetti potenzialmente includibili nello studio. I pazienti eleggibili soddisfano tutti i criteri di inclusioni principali dello studio, in particolare sono stati trattati con HAART durante la infezioni acuta primaria, una volta ottenuta la non determinabilità di HIV-RNA nel plasma (≤ 20 copie/ml), questa deve essere mantenuta per un periodo (3) 12 mesi, in assenza di blip di viremia. Al gennaio 2005 sono stati arruolati 15 pazienti: il trattamento con HAART dal momento della diagnosi di infezione acuta è fatto di 4.9 ± 0.8 (media \pm -SD)anni, tutti i soggetti hanno ottenuto una soppressione completa della replicazione di HIV che si è mantenuta tale per 3.6 ± 0.7 anni. Al momento di 9 di 15 soggetti hanno iniziato le procedure relative allo studio e sono stati eseguiti i test geno/fenotipici per la definizione del quadro di resistenza farmacologica. Una volta ottenuti i risultati i pazienti inizieranno il periodo di induzione con micofenolato per poi interrompere la HAART.

Conclusioni: La prima fase del progetto è stata portata a termine seguendo la timeline indicata nel progetto. La contemporanea attivazione delle procedure di stoccaggio del materiale biologico, consentirà di avere a disposizione adeguate quantità di campioni per le analisi da effettuarsi negli anni di studio successivi.

Contributo: 45F.41

WP3 TASK 12 ADJUVANTICITY OF IL-15 IN A MULTIPROTEIN, PRIME-BOOST REGIMEN OF IMMUNIZATION WITH THE SIV/HIV VACCINE ANTIGENS IN PRECLINICAL STUDIES

Federica Crostarosa* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Leonardo Sernicola (*); Stefania Farcomeni (*); Stefania Catone (*); Maria Teresa Maggiorella (*); Fausto Titti (*)

Background: In a previous study, we identified in the SIV/cynomolgus model a combination of recombinant vectors (DNA/SFV/MVA) expressing structural [gag,pol,env] and regulatory [rev,tat,nef], SIV proteins, significantly controlled up to undetectable level the virus replication that was associated with the robust anamnestic IFN-g/ELISPOT responses to all vaccine antigens. However this vaccination regimen failed to induce detectable level of neutralising antibodies. The overall objective of the whole proposal was to refine the protective efficacy of the multiprotein vaccine approach by using IL-15 as immune adjuvant. In particular, according to the timeline of work activities for the reporting period, 4 deliverables have been indicated: D1. preparation of pDNAs; D2. effects of vectors \pm hIL-15 on DCs and vaccine antigens expression; D3. effects on monkeys (pilot study); D4. increase of the threshold of vaccine antigen-specific immune responses (systemic and mucosal) in mice induced by murine IL-15.

Methods: - simian IL-15 was cloned into the expression vector co-expressing the green fluorescent protein (pHR-CMV IRES 2 GFP) - monkeys previously intravenously infected with pathogenic SHIV89.6P, were inoculated with 700 mg of pIL15 intradermally at day 0; 500 mg intramuscularly at day 4; 700 mg intradermally at week 2; 3 infected monkeys were inoculated with empty plasmid with the same schedule. - immunological assays (proliferation, IFN γ /ELISPOT, phenotyping) were performed using established procedures. - viral loads (plasmaviremia and provirus) were quantitated by Real time RT- and DNA-PCR assays by using an ABI Prism 7700.

Results: We continued the monitoring (up to week 111 after the challenge) of monkeys previously vaccinated with DNA/SFV/MVA. We report that the vaccinated monkeys exhibited a dramatic and persistent clearance of virus both at mucosal (lymph nodes) and systemic sites. The absence of chronic infection is also demonstrated by the substantial absence of T cell responses and by a level of Perforin $^{+}$ and Granzyme B $^{+}$ cells in lymph node of vaccinated and protected monkeys that was lower than that found in infected monkeys but similar to that quantitated in the lymph node cells of naïve monkeys. According to the timeline of the work activity, (D1), working stocks of DNA plasmids expressing mouse and monkey IL-15, structural and regulatory SIV/HIV proteins have been prepared for *in vitro* and *in vivo* studies. In addition, as further implementation of the project, new bacterial carrier (attenuated Salmonella) has been provided. Because of the availability of monkeys infected with SHIV89.6P, the activity associated with D4 was anticipated. pIL-15 was given to a naïve monkey and induced proliferative responses in un-stimulated PBMCs. When pIL15 was given to SHIV 89.6P-infected monkeys systemic toxicity was not observed. Plasmaviremia and proviral DNA loads were not affected by the IL-15 treatment. Similarly, T cell immune responses to Tat, Gag and Env antigens, lymphocyte subsets (CD4/CD28/CD95/CD8/CD56) and NK activities were not modified. However, when tested *in vitro*, PBMCs from all monkeys did respond to the *in vitro* stimulation with recombinant IL15.

Conclusions: The DNA/SFV/MVA vaccination induced a persistent protective immunity. The present study indicate that short-term treatment with pIL15 is well tolerated and causes no measurable changes in viral loads and immune responses in chronically SHIV-infected monkeys. It remain to elucidate the contrasting results obtained from *in vitro* and *in vivo* responses.

Grant: 45F/C

PREPARATION, *IN VITRO* AND *IN VIVO* TITRATION IN CYNOMOLGUS MONKEYS OF CHALLENGE STOCK SHIV VIRUS

Fausto Titti* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Stefania Farcomeni (*); Piergiorgio Pupino Carbonelli (*); Maria Teresa Maggiorella (*); Leonardo Sernicola (*); Stefania Catone (*); Silvia Baroncelli (*); Roberto Belli (*); Elio Iale (*); Fabio Incitti (*); Massimo Azzetti (*); Alessandro Avitabile (*); Massimo Chiodi (*); Adelmo Marini (*); Aurelio Cafaro (*); Barbara Ensoli (*)

Background: The macaca species had provided one of the best animal models for AIDS vaccine development. The overall objective of the ICAV proposal is the development of an affective vaccine for human AIDS by using cynomolgus monkeys as preclinical model. In this framework, proteins of HIV will be used as potential vaccine candidates (Tat, Rev, Env). Since the SIV-macaca model does not contain HIV genes, we planned to use a chimeric SIV/HIV virus (SHIV) that contains HIV genes of interest, is replication competent and highly pathogenic in monkeys. The objective of this proposal is the production, *in vitro* characterization and intrarectal/intravenous titration in cynomolgus monkeys of the pathogenic SHIV.

Methods: Male cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) from the Mauritius breeding colony were matched for source and for comparable age and weight, and maintained in accordance with European guidelines for non-human primate care (EEC Directive No. 86-609, Nov.24, 1986). All monkeys were negative for infections with SIV, SRV-1, -2, -5, STLV-I viruses, simian herpes B virus, CMV and Ebola and Marburg viruses. Flow cytometry analyses was used to determine the lymphocyte subsets (CD3, CD4 and CD8) from citrated whole blood cells according to the established procedures. Anti-SIV, -HIV antibody titres were determined by using commercially available ELISA kits. Viral loads (plasmaviremia and proviral DNA) was quantitated by using Real time RT- or DNA-PCR analyses according to the procedures standardised in our laboratory. Endovenous titration: 1 ml of ten fold serial dilution (from 10⁻⁴ to 10⁻⁸) of viral stock was intravenously inoculated into 12 sedated monkeys. Two monkeys for each dilution were inoculated apart from 10⁶ to 10⁻⁷ dilutions for which 3 monkeys were used. Intrarectal titration: 1 ml of ten fold serial dilution (from 10⁻¹ to 10⁻⁵) of viral stock was intravenously inoculated into 14 sedated monkeys. Three monkeys for each dilution were inoculated apart from 10⁻¹ dilution for which 2 monkeys were used.

Results: To prepare a new stock of SHIV89.6P, one monkey was intravenously infected with SHIV89.6P. The proviral load was monitored during early days after infection and at the time of the peak viremia the animal was sacrificed. Blood, lymph node and spleen mononuclear cells were collected, and CD8-depleted cells were stimulated with PHA to induce massive viral replication. When high virus replication was obtained, as detected by the reverse transcriptase activity, the cell-free supernatant was collected, aliquoted and stored in liquid nitrogen. A total of 190 vials were obtained. This viral stock was titred *in vitro* (C8166 human T cells) given a mean titre of 3.6x10⁵ TCID₅₀/ml. The same viral stock was titred *in vivo* and according to the site of inoculum two different titres have been calculated: 3.16 x10⁶ MID₅₀/ml when the virus was given intravenously and 5.8x10² MID₅₀/ml when the virus was given intrarectally. The SHIV89.6P maintained its pathogenicity according to its ability to induce in infected macaques a dramatic CD4⁺ cell depletion early after infection.

Conclusions: Stock of SHIV89.6P has been produced and titred *in vivo* for both intravenous and mucosal challenge. This challenge stock will be available for the efficacy studies in monkeys either for mucosal or intravenous challenge.

Grant: 45F/C

DEVELOPMENT OF HIV-1 TAT, REV, NEF, GAG AND ENV VACCINE PROTOTYPES BASED ON NOVEL POLYMER-BASED DELIVERY SYSTEMS

Luisa Tondelli* (CNR ISOF); Marco Ballestri (*); Silvia Spaccasassi (*)

Background: With the continuing advances of recombinant DNA technology more and more gene and protein drugs and vaccines are potentially available. However, due to the poor stability and transport problems across biomembranes of DNA and proteins, the development of artificial carriers to effectively deliver the drug to a specific site is of great importance and remains a challenge. A number of particulate delivery systems are still included in lists of vaccine adjuvants, whose principal mode of action is to promote the uptake of antigens into the key APC responsible for the induction of immune responses. In delivery systems consisting of colloidal nano/microspheres, the biologically active material is usually dissolved, entrapped or encapsulated into the particles. However, the instability or degradation of drugs and/or antigens following encapsulation and/or polymer biodegradation is still a limiting factor for their pharmaceutical application, especially when full preservation of the drug native structure is required. To overcome the problems of DNA and protein encapsulation inside polymeric matrices, we have recently designed and studied some biocompatible polymethylmethacrylate (PMMA) nano/microspheres able to efficiently adsorb biologically active biomacromolecules onto the outer surface, via reversible specific or non specific interactions.

Methods: Dynamic light scattering (PCS) and microelectrophoresis measurements (ZP) were run in the presence of different buffers (sodium phosphate, PBS, cell culture medium, free serum). Adsorption and release experiments of DNA and proteins onto core-shell nano/microspheres were measured as a function of antigen/microsphere ratio (w/w), pH and ionic strength of the incubation medium by means of UV-VIS spectrophotometric methods, HPLC, CD and PAGE.

Results: We investigated the ability of previously prepared polymeric nanostructures (R.U. Michele Laus) to reversibly bind Tat, Nef and Gag DNA and proteins to increase their biological activity *in vitro* and *in vivo* (R.U. Antonella Caputo and Barbara Ensoli). To this purpose, the following delivery systems have been studied with model plasmid DNA and proteins: 1) Pegylated core-shell nanospheres, prepared by emulsion polymerisation: the inner core is mainly constituted of poly (methylmethacrylate) (PMMA), the outer shell is characterised by hydrophilic chains deriving from polyethyleneglycol(PEG) methacrylate bearing cationic groups, able to reversibly bind DNA. 2) Core-shell nanospheres, obtained by emulsion polymerization of methylmethacrylate in the presence of Eudragit L100/55 or eudragit E100, a commercial hydrophilic polymer bearing carboxyl and amino functional groups, able to specifically bind and release basic and acid proteins.

Conclusions: Several samples of novel polymeric core-shell nanospheres were investigated for their ability to reversibly bind DNA and proteins, thus demonstrating that: 1) the amount of DNA and protein adsorbed onto the outer surface of nanospheres can be modulated according to the medium composition 2) DNA and protein release occurs upon incubation with increasing amounts of salts and/or detergents and can be modulated according to the amount of adsorbed antigen. In addition, preliminary results indicate that Tat-DNA and Tat protein native structures are maintained upon adsorption/release on/from microspheres, thus leading to the maintenance of their biological activity.

Grant: 45F.42

ANTI-TAT SPECIFIC IMMUNE RESPONSE IN HUMAN NATURAL MODEL OF RESISTANCE TO INFECTION SUCH AS MULTIPLY EXPOSED UNINFECTED INDIVIDUALS (MEU)

Antonella Tripiciano* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Valeria Fiorelli (*); Arianna Scoglio (*); Barbara Collacchi (*); Maria José Ruiz Alvarez (*); Concettina Giannetto (*); Antonina Letizia Fazio (*); Giovanni Paniccia (*); Massimo Giuliani** (*IRCCS S. Gallicano, Roma*); Angela Arancio (**); Francesca Stivali (**); Vittorio Francavilla (*); Olimpia Longo (*); Aldo Di Carlo (**); Barbara Ensoli (*); Fabrizio Ensoli (**)

Background: Multiply Exposed Uninfected individuals (MEU) represent an extremely valuable population to identify correlates of protection from HIV infection, which are essential for developing an effective preventive vaccine against HIV/AIDS. In particular, MEU represent a human model of resistance to infection, since they remain uninfected despite multiple unprotected exposures with HIV-infected partners. Protection from disease or infection could be due to differences of the immune response to the virus, both natural and acquired. In fact, several data indicate that immunological and genetic factors can affect the efficiency of transmission of HIV infection as well as disease progression. In the present study, we are evaluating the presence of a specific humoral immune response against the HIV-1 Tat protein in a cohort of MEU individuals from the center for Sexually Transmitted Diseases at the IRCCS S. Gallicano Hospital (SGH).

Methods: The determination of anti-Tat IgG and IgM in a cohort of MEU individuals, composed of subjects repeatedly exposed to HIV through sexual receptive intercourses over many years and remaining seronegative as demonstrated by repeated HIV testing, is based on an algorithm developed on the basis of two different ELISA assays in order to obtain high levels of sensitivity and specificity using, as antigen, a recombinant, purified, native Tat protein derived from the IIIB strain (BH-10 clone) of HIV-1 (clade B) (Buttò *et al.*, *J. Infect Dis.* 2003).

Results: A cross-sectional analysis on serum samples from 99 individuals from the study cohort is close to completion. Additional ongoing studies are aimed at the following evaluations: a) epitope mapping of the anti-Tat Ig; b) perspective and retrospective assessment of the humoral and cellular immune response against HIV-1 Tat as well as other regulatory antigens (Nef).

Conclusions: The identification and characterization of innate and specific immune responses toward HIV antigens in MEU individuals might be key to the identification of novel vaccine candidates. Results from this study may help in identifying B-cells epitopes which might have a role in the protection against HIV-1 infection and disease.

Grant: 45F/C

A RESEARCH TO DEFINE METHODOLOGICAL GUIDELINES TO ASSESS SERONEGATIVE-SEROPOSITIVE VOLUNTEERS IN CLINICAL TRIALS TO HELP BOTH MEDICAL AND PSYCHO-SOCIAL INVESTIGATORS TO GIVE SUPPORT TO THEM

Raffaele Visintini* (*Ospedale S. Raffaele, Milano*); Alessandro Ubbiali (*); Elisabetta Cattaneo (*)

Background: L'équipe del Servizio di Psicologia Clinica della Salute si occupa, sia dell'assessment personologico, sia del sostegno psicologico dei pazienti sieropositivi. I dati provenienti dalle ricerche dell'équipe sottolineano di prestare particolare attenzione a costrutti psicologici quali l'attaccamento adulto, l'impulsività e la capacità di autodirezionarsi, che possono giocare un ruolo cruciale sia nell'abbandono delle psicoterapie, sia nella non aderenza alle terapie antiretrovirali dei pazienti sieropositivi. Partendo da queste considerazioni il reclutamento di volontari sieropositivi per i trials vaccinali non può prescindere da un'attenta valutazione di alcune variabili psicologiche, potrebbero interferire nel medio lungo termine con l'aderenza stessa ai trials vaccinali. Tuttavia queste premesse sembrano estendibili solo in parte nel reclutamento di volontari sieronegativi, in quanto alcune osservazioni emerse durante la valutazione dei partecipanti alla sperimentazione vaccinale della proteina TAT suggeriscono che vi siano alcune motivazioni implicite differenti tra i due gruppi di volontari. Per questa ragione si è scelto di esplorare preliminarmente quali aspetti psicologici possano influenzare, nei soggetti sieronegativi, la scelta di partecipare ai trials vaccinali.

Metodi: Sono stati istituiti dei focus-group tra i clinici e i ricercatori dell'ospedale San Raffaele, direttamente o indirettamente coinvolti negli aspetti gestionali dalla patologia HIV, con l'obiettivo di far emergere possibili elementi di interesse psicologico e non solo psicopatologico in grado di orientare in maniera implicita l'adesione ai trials vaccinali dei soggetti sieronegativi.

Risultati: I risultati dei focus-group confermano le impressioni cliniche dell'équipe, sostenendo la necessità di investigare, anche nei soggetti sieronegativi, costrutti psicologici quali le modalità di attaccamento adulto e l'impulsività. Intimamente connesso al costrutto dell'impulsività è emerso quello dell'aggressività, come elemento in grado di interferire con l'adesione ai trials vaccinali in tutti i volontari. Infine è emerso un elemento d'interesse psicologico non completamente sovrapponibile ai precedenti e presumibilmente di maggior interesse nei volontari sieronegativi, che riguarda la capacità di condivisione e soprattutto il senso di appartenenza. Questo elemento, inteso come la capacità di percepire un sentimento d'appartenenza ad un gruppo sociale è una delle funzioni basiche della personalità normale e la sua presenza negli individui candidati al ruolo di volontari ai trials vaccinali, potrebbe giocare un ruolo cruciale.

Conclusioni: I risultati suggeriscono che entrambe le tipologie di candidati devono soddisfare alcuni requisiti comuni per ciò che concerne l'assetto personologico, nella sua duplice declinazione temperamentale e caratteriale. Gli stili di attaccamento adulto, i livelli di impulsività e quelli di aggressività richiedono altresì di essere monitorati, al fine di escludere possibili elementi di interferenza con l'adesione nel medio lungo termine ai trials vaccinali. Infine, la capacità di condivisione e il senso di appartenenza sembrano emergere come abilità individuali da non sottovalutare nella scelta dei soggetti sieronegativi. Non sembra pertanto irrazionale che i clinici, attraverso specifici approfondimenti durante i colloqui preliminari, investighino questi elementi e in maniera analoga i ricercatori considerino la possibilità di implementare la batteria diagnostica con test atti a misurare queste abilità individuali.

Contributo: 45F.44

EFFECT OF THE HIV-1 TAT PROTEIN ON CTL ACTIVATION

Silvia Cellini* (*Università degli Studi di Ferrara*); Cinzia Fortini (*); Fabiola Micheletti (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Stefano Volinia (*); Riccardo Gavioli (*)

Background: Tat protein is among the first genes expressed during HIV infection and is essential for gene expression and virus production by acting as potent transactivator of the HIV LTR promoter. During acute infection of T cells by HIV-1, Tat is also released in the extracellular milieu and the protein is taken-up by neighbor cells where it modulates viral and/or cellular function. In addition Tat and the other HIV regulatory proteins modulate cellular immune responses at different levels. Tat protein targets and induces maturation of dendritic cells increasing Th1-specific immune responses. In several studies it has been shown that chimeric polypeptides containing amino acids 47-59 of Tat enter the cells and increase CTL responses to the conjugated antigen and the higher immunogenicity of these Tat-delivered antigens is not due to increased cellular uptake, suggesting that Tat possesses poorly defined immunomodulatory properties.

Methods: To address the effect of on the Tat reactivation of epitope-specific memory T cell responses, PBLs from EBV-positive donors were stimulated *in vitro* with APCs pulsed with EBV-derived peptides corresponding to immunodominant or subdominant epitopes in the presence or absence of native Tat protein. The presence of peptide-specific T cell responses was evaluated by chromium release assay and by IFN γ assay. To evaluate T cells proliferative responses PBLs were activated with different T cells activation stimuli and cultured in presence or not of Tat protein and proliferation was determined by 3[H]thymidine incorporation. *In vivo* experiments were also carried out using mice immunized with CTL epitopes alone or in presence of Tat.

Results: Tat protein markedly augments the generation of peptide specific CTLs and the positive effect of Tat was not mediated by the induction of CTL effectors with an augmented cytotoxic capacity but the protein was able to increase the expansion phase of CTL precursors from the memory T cell pool. Infact the number of epitope responder cells is significantly higher in CTL cultures reactivated in the presence of Tat protein. Consistently, the T cell proliferation of freshly isolated PBLs in response to different EBV-derived peptides was markedly increased in the presence of Tat. We also found that Tat was able to increase specific CTL responses in mice vaccinated with relevant CTL epitopes.

Conclusions: We have shown that Tat protein increase *in vitro* and *in vivo* memory T cells responses directed to other antigens. In particular we have demonstrated that the effect of Tat correlates with an augmented expansion of reactivated precursors from the circulating memory pool. At present we are analyzing by microarray and immunological assays the effect of Tat protein on the gene expression, phenotype and cytokine release of activated T cells to define the mechanism responsible for the positive effect of Tat protein on T cell activation. The immunomodulatory capacities of Tat may have important application in vaccination protocols and in the design of new HIV vaccine due to its double role as antigen and novel adjuvant.

Grant: 45F.43

INDUCTION OF HIV NEUTRALIZING ANTIBODIES USING FUSION COMPLEXES AND A CD4-INDEPENDENT ENV

Donato Zipeto* (*Università degli Studi di Verona*); Andrea Matucci (*); Paola Rossolillo (*); Marco Turci (*); Chiara Ripamonti** (*DIBIT, Milano*); Gabriella Scarlatti (**); Umberto Bertazzoni (*)

Background: The narrow spectrum of most HIV-specific antibodies points to the need for new immunogens, based on highly conserved epitopes. HIV-1 infects host cells by membrane fusion, mediated by the formation of fusion complexes between the envelope glycoproteins gp120/gp41, the CD4 receptor and a coreceptor, CCR5 or CXCR4. During this membrane fusion process conserved epitopes are exposed that may be used as targets for the induction of virus neutralizing antibodies. Neutralizing antibodies active against different primary isolates of HIV-1 may be obtained by immunizing mice with fusion complexes on which these conserved epitopes have been stabilized by chemical fixation, or with gp120/gp41 with a CD4-independent phenotype, on which conserved epitopes may be already exposed.

Methods: Different conditions have been tested for the preparation of fusion complexes capable of inducing broad-spectrum neutralizing antibodies to HIV-1. Fusion complexes were prepared using cells expressing the gp120/gp41 cocultivated with cells expressing the receptors CD4 and CCR5 at different fusion temperatures, corresponding to intermediate stages of the membrane fusion process, and stabilized using different chemical fixatives. Mice were immunized in order to identify the conditions resulting in the best induction of HIV neutralizing antibodies. Sera were collected, antibodies purified and tested in neutralization assays against heterologous HIV-1 isolates. Furthermore, syngenic balb/c mouse cells have been transfected to express a gp120/gp41 with a CD4-independent phenotype and will be used to assess their capability to induce broad spectrum neutralizing antibodies.

Results: The results obtained indicate that:1) Fusion complexes prepared at 21, 30 and 37°C were immunogenic and induced neutralizing antibodies against both R5 and X4 HIV-1 heterologous isolates;2) Extensive purification and dialysis of antibodies allowed the removal of any aspecific cytotoxic effect;3) Complexes prepared at 37°C were more immunogenic and induced higher titers of neutralizing antibodies than complexes prepared at lower temperatures;4) Titer of neutralizing antibodies was not affected by the fixative used;5) Neutralizing activity was retained after CD4-CCR5 antibody removal, in particular for fusion complexes prepared using paraformaldehyde as fixative.

Conclusions: The results obtained indicate that fusion complexes are immunogenic and induce neutralizing antibodies against heterologous HIV-1 isolates. Removal of non-specific inhibitors that confused early promising results of studies with fusion complexes is necessary to obtain a specific antibody response. Although fusion complexes are capable to induce HIV neutralizing antibodies, vaccine formulation based on whole cells will not be suitable for human use, and purification of fusion complexes cannot lead to large scale preparations. Thus the need of producing and selecting neutralizing monoclonal antibodies, in order to identify specific immunogenic structures and epitopes that may be used to induce neutralizing antibodies when administered in a suitable delivery system. In parallel, antibodies that will be obtained by immunizing with a CD4-independent gp120/gp41, and antibody fragments (Fabs and ScFv) isolated through phage display libraries panning, will be evaluated for their broad-spectrum neutralizing activity against different HIV-1 isolates with and without the addition of sCD4 or CD4-like antibodies.

Grant: 45F.45

Progetto
Aspetti psicosociali

Responsabili scientifici
Prof. Antonio BOSCHINI e Dr. Giovanni REZZA

FATTIBILITÀ DELLA DIRETTA OSSERVAZIONE DELLE TERAPIE ANTIRETROVIRALI NEI PENITENZIARI ITALIANI

Sergio Babudieri (*Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi di Sassari*); Sergio Carbonara (*Clinica delle Malattie Infettive, Università degli Studi di Bari*); Giulio Starnini* (*Dip. dell'Amministrazione Penitenziaria, Roma*); Roberto Monarca (*Unità Operativa di Malattie Infettive, Azienda Ospedaliera "Belcolle", Viterbo*); Benedetta Longo (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Bruna Brunetti (*)

Background: Nel Sistema Penitenziario Italiano al 30/12/2004 erano ristretti 56.068 detenuti. Le stime disponibili per tale ambito indicano come gli accertamenti diagnostici e gli interventi terapeutici in carcere debbano essere programmati per circa 4-5.000 pazienti anti-HIV positivi giornalmente residenti. La necessità di ottimizzare le terapie in pazienti, quali i detenuti, ed in ambienti, quali le carceri, particolarmente "difficili", spinge a verificare la fattibilità dell'adozione della strategia DOT (Directly Observed Therapy) per la somministrazione delle terapie anti-retrovirali (ART) all'interno degli Istituti Penitenziari Italiani. Gli obiettivi della DOT nelle comunità chiuse residenziali penitenziarie, sono il miglioramento dell'aderenza, il recupero alla terapia di pazienti altrimenti non controllabili e la riduzione del numero dei serbatoi di ceppi HIV-MDR. Le osservazioni sulla DOT-HAART eseguite in carcere, durante l'assistenza domiciliare di pazienti non-aderenti ed alla distribuzione del metadone nei servizi per tossicodipendenti, indicano elevati incrementi dell'accettazione delle terapie ed un aumento medio del 20% della soppressione di HIV con la DOT rispetto alla somministrazione auto-gestita. Questo suggerisce che una applicazione intramuraria della DOT possa rappresentare una strategia ottimale in tali contesti.

Metodi: Un questionario contenente 18 domande sull'organizzazione sanitaria relativa alla terapia dell'infezione da HIV in ogni singolo Istituto, ed una scheda per un rilevamento puntuale sulla terapia anti-retrovirale in carcere, sono stati inviati dal Dipartimento dell'Amministrazione Penitenziaria a tutti i 205 Istituti Penitenziari Italiani. L'analisi è stata eseguita confrontando le risposte dei singoli Istituti con i risultati dell'effettiva somministrazione delle terapie al momento della valutazione.

Risultati: Hanno fornito una risposta completa 127 Istituti (62%), di cui 64 (50,4%) somministrano la terapia anti-HIV. In questi, risulta che la ART viene consegnata in cella (60,6%) o in infermeria (31,5%) dagli Infermieri (88,4%) e che la consegna viene effettuata ad ogni somministrazione (58,3%) ovvero solo una volta al dì (29,1%), ma che l'orario coincide con quello dell'assunzione (85%). Nel 38,6% degli Istituti Penitenziari la terapia viene consegnata giornalmente ma lasciata all'autogestione del paziente, mentre nel 37,0% viene direttamente osservata ad ogni orario di assunzione, e nei casi rimanenti vengono adottate strategie intermedie. Al momento dell'esecuzione dello studio risultavano in terapia 437 pazienti, di cui 75,7% in HAART, 24,3% con uno schema a due farmaci. La diretta osservazione dell'assunzione dei farmaci a tutte le somministrazioni avveniva in 273 (62,5%) di questi, mentre in 50 (11,4%) avveniva solo una volta al dì. Il 63,3% dei Medici che hanno fornito risposte attendibili, ha definito come applicabile la strategia DOT nella realtà organizzativa del proprio Istituto Penitenziario.

Conclusioni: Solo il 31,2% di tutti gli Istituti Penitenziari Italiani ha dichiarato di somministrare ART. In questi la strategia DOT risultava applicata in due pazienti su tre. Le modalità di somministrazione sono risultate prevalentemente corrette in rapporto alle schedule terapeutiche. La DOT per la cura dell'infezione da HIV appare applicabile nelle carceri italiane.

Contributo: 60F.1

VALUTAZIONE DELLA ACCESSIBILITÀ E DELLA QUALITÀ DELLE PROCEDURE DIAGNOSTICO-TERAPEUTICHE IN ODONTOIATRIA

Roberto Cauda* (*Istituto di Malattie Infettive, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Michele Giuliani** (*Istituto di Clinica Odontoiatrica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*); Carlo Lajolo (**); Mario Tumbarello (*)

Background: Il presente progetto di ricerca si propone di concludere lo studio già finanziato nell'ambito del "IV Progetto di Ricerca sull'AIDS". Nella prima parte dello studio è stata valutata la accessibilità e la qualità delle procedure diagnostico-terapeutiche in odontoiatria viste da parte dei pazienti HIV positivi. Nella seconda parte dello studio verrà valutata la accessibilità e la qualità delle procedure diagnostico-terapeutiche in odontoiatria viste da parte dei dentisti.

Metodi: Nella prima parte dello studio, è stato effettuato uno studio multicentrico mediante un questionario autocompilato, completamente anonimo, distribuito a soggetti affetti da infezione da HIV tramite 6 strutture specializzate nella cura di soggetti con infezione da HIV in diverse regioni italiane. Il questionario ha valutato i dati personali, i rapporti con il dentista e, qualora i soggetti si fossero rivolti a strutture pubbliche, che tipo di assistenza abbiano ottenuto in tali strutture. La seconda fase del progetto prevede l'utilizzo di un questionario completamente anonimo destinato ai medici-dentisti. Il questionario verrà inviato tramite posta a circa 5000 professionisti in diverse regioni d'Italia. Insieme al questionario verrà inviata una busta già indirizzata e preaffrancata in modo da favorirne la riconsegna.

Risultati: L'analisi dei dati ottenuti dalla prima parte dello studio svoltosi nei centri partecipanti allo studio ha riguardato un campione di 883 soggetti. L'età media del campione è stata 39.5 anni, 66.1% erano maschi e 33.9% femmine. Di questi il 71.6% ha fatto dei controlli odontoiatrici dopo l'infezione da HIV e di questi il 33.2% non ha comunicato al proprio dentista di essere sieropositivo. Dei 421 soggetti che hanno comunicato al dentista la loro sieropositività al momento delle cure odontoiatriche, 56 hanno ricevuto una risposta negativa alla richiesta di cura. 69 questionari, secondo una valutazione aggiuntiva, sono stati ritenuti appartenenti a soggetti che hanno provato una forte disagio nel rapporto con il proprio dentista. Tale disagio sembrerebbe essere correlato all'aver effettuato visite odontoiatriche presso dentisti privati precedentemente alla scoperta della sieropositività (OR=2.68, 95%IC=1.43-5.00, p=0.002). 384 soggetti sono entrati in contatto con una struttura pubblica per le cure odontoiatriche. Dei 334 soggetti che hanno risposto alla domanda sulla sensazione di essere discriminato dalla struttura pubblica il 77% si è dichiarato soddisfatto dell'assistenza ricevuta. La necessità di effettuare cure odontoiatriche dopo il riscontro dell'infezione da HIV (OR=3.13, 95%IC=2.13-4.60, p<0.001), reddito inferiore a 10000 €/anno (OR=1.4, 95%IC=1.00-2.07, p<0.04) ed il titolo di studio di scuola media inferiore (OR=1.51, 95%IC=1.08-2.11, p=0.001) sembrerebbero essere associati in maniera statisticamente significativa alla scelta di rivolgersi a strutture assistenziali di tipo pubblico.

Conclusioni: Sulla base dei dati acquisiti dalla prima parte dello studio è lecito aspettarsi che questa ricerca permetterà di acquisire ulteriori informazioni per meglio chiarire il complesso rapporto tra dentisti e soggetti sieropositivi e di promuovere iniziative per migliorarne l'assistenza odontoiatrica.

Contributo: 60F.5

ASSISTENZA RIPRODUTTIVA ALLE COPPIE HIV-1 DISCORDANTI:IMPATTO SULLA PREVENZIONE DEL RISCHIO DI TRASMISSIONE SESSUALE E MATERNO- FETALE, SULLA COMPLIANCE ALLA TERAPIA E SULLA QUALITÀ DELLA VITA

Valeria Savasi* (Clinica di Ostetrica e Ginecologia, Dip. di Scienze Cliniche, Ospedale L. Sacco, Milano); Enrico Cazzaniga (Anlaids, Lombardia); Manuela Crivelli (*); Rosaria Iardino (Cure, Onlus); Enrico Ferrazzi (*)

Background: Il Centro di Riproduzione Assistita della Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Ospedale Sacco assiste coppie sierodiscordanti per l'infezione da HIV, nel desiderio di avere un figlio. L'assistenza che si svolge presso questo Centro prevede *counselling* riproduttivo, valutazione del profilo di fertilità della coppia, attuazione in tutte le coppie di una tecnica di laboratorio conosciuta con il nome di "Sperm washing" per eliminare la componente virale dell'HIV presente nel seme del soggetto maschile. Obiettivi: La ricerca si pone l'obiettivo principale di cercare di studiare l'aspetto psicologico e sociale all'interno del quale avvengono le scelte riproduttive e quali sono le principali ricadute. L'innovazione che introduciamo è la formazione di gruppi di autoaiuto, esperienza già molto nota per il superamento dei traumi psichici, ma assolutamente mai provata nei gruppi che si avvalgono della riproduzione assistita. Obiettivo 1: Valutare quale impatto ha la partecipazione a un programma di riproduzione assistita sulla malattia: *compliance* verso terapie e esami, Valutare il ruolo della genitorialità, Valutare i cambiamenti nella coppia: distribuzione dei compiti, ridefinizione dei ruoli, sessualità, Valutare il fallimento delle tecniche. Obiettivo 2: Formazione di un Gruppo di Auto Mutuo Aiuto (AMA) tra le coppie di genitori che hanno avuto un figlio e quelle in attesa. Obiettivo 3: Costituzione di Gruppi Educativi per fornire informazioni tecniche e *counselling* psicologico alle coppie che non possono partecipare al Gruppo AMA durante il periodo del ciclo delle FIVET e ICSI.

Metodi: Per ogni obiettivo si è cercato di trovare uno strumento adeguato che potesse soddisfare gli scopi che ci siamo proposti. Per l'obiettivo 1 questionari costruiti ad hoc per la valutazione degli obiettivi: 3 questionari per le tre tipologie di campione in studio. (questionario A, B, C) Analisi Retrospectiva: coppie che hanno avuto un figlio da almeno 6 mesi fino a 2 anni: questionario A. Analisi Prospettiva: Coppie che iniziano il programma e che desiderano un figlio. Queste coppie saranno intervistate ad un tempo 0 e a 18 mesi. Obiettivo 2: Convocazione in un luogo idoneo e riservato dove poter riunire un gruppo pilota di autoaiuto (10-12 persone) per un periodo di 18 mesi: il gruppo sarà composto sia da coppie che hanno avuto il figlio, sia quelle che stanno seguendo il programma. Obiettivo 3: Gruppi Educativi per l'informazione tecniche e *counselling* psicologico durante il periodo del ciclo delle FIVET e ICSI. Due incontri nelle due settimane del ciclo.

Risultati: Riteniamo che alla fine della ricerca saremo in grado di tracciare un quadro psicologico delle coppie HIV discordanti. Lo studio è originale soprattutto per introduzione dei gruppi di autoaiuto, esperienza già molto nota per il superamento dei traumi psichici, ma assolutamente mai provata nei gruppi che si avvalgono della riproduzione assistita.

Conclusioni: Tale studio potrebbe essere di grande rilevanza. Da una parte ci permetterà di analizzare uno degli aspetti più sconosciuti e più affascinanti come quello di una possibile influenza del benessere psicologico sulle malattie croniche, e dall'altro potrebbe evidenziare la necessità di un supporto psicologico nei Centri che si occupano di riproduzione assistita.

Contributo: 60F.7

CARATTERISTICHE PSICO-SOCIO-COMPORAMENTALI DI UN CAMPIONE DI UTENTI DEL TELEFONO VERDE AIDS DELL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Pietro Gallo* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Anna Maria Luzi (*); Barbara Suligoj (*); Laura Camoni (*); Anna Colucci (*); Angela Santoro (*); Rudi Valli (*); Anna D'Agostini (*)

Background: Nell'ultimo decennio l'epidemia da HIV si è allargata, spostandosi verso gruppi di popolazione che non si percepiscono "a rischio" e che non considerano la possibilità di effettuare un test per la ricerca degli anticorpi anti HIV, in quanto convinti di non essersi mai esposti ad alcuna fonte di infezione. Infatti, è progressivamente aumentata la proporzione di persone che scopre di essere sieropositiva in fase avanzata di malattia, tanto da costituire la metà (53,2%) di tutti i casi di AIDS diagnosticati negli ultimi anni. Il presente studio si propone di caratterizzare i soggetti che non effettuano il test HIV, allo scopo di contribuire a stimare la quota di persone sieropositive che, non sottoponendosi al test, provocano una distorsione dei dati sulla diffusione del virus in Italia, riducendo le stime di prevalenza e di incidenza dell'infezione. Pertanto, obiettivo principale dell'indagine è studiare le caratteristiche delle persone che non si sottopongono al test HIV e stimarne la quota rispetto alla popolazione generale.

Metodi: Survey telefonica rivolta agli utenti del Servizio Telefono Verde AIDS dell'Istituto Superiore di Sanità che non hanno mai effettuato il test HIV. Al campione è somministrato un questionario anonimo, opportunamente preparato, per raccogliere informazioni socio-anagrafiche e dati sulle motivazioni che non favoriscono l'effettuazione del test HIV, sull'appartenenza a determinati gruppi (donatori di sangue, ricoverati, persone con MST, donne che hanno avuto gravidanze) e sulla percezione del rischio. Tali informazioni vengono rilevate, dietro consenso, al termine dell'intervento di *counselling* telefonico.

Risultati: Dall'analisi preliminare dei dati relativi ai questionari raccolti nel periodo che va dal 7 febbraio – 9 marzo 2005, le persone con i requisiti previsti dall'indagine risultano essere 172, di queste 7 hanno rifiutato il questionario. Dei 165 utenti che hanno risposto 139 (84,2%) sono maschi. L'età media risulta essere di 29,6 anni [range di 18-63]. Per quanto riguarda il grado di istruzione il 63,6% ha il diploma il 19,4% la licenza media, e il 17,0% la laurea. Il 74,5% di utenti è costituita da single, il 20% da coniugati e il rimanente 5,5% da conviventi e vedovi. Rispetto all'occupazione i due terzi risultano essere occupati, i rimanenti studenti (22%) e disoccupati (8%). Il 58,2% è costituito da persone che non hanno una relazione fissa (14% clienti prostitute, 44,2% pluripartner) e il 4% sono omo o bisessuali. Il 94% degli utenti ha avuto il primo rapporto sessuale all'età mediana di 18 anni e la metà del nostro campione ha avuto meno di 5 partner; il 62,4% dei soggetti intervistati ha subito almeno un ricovero ospedaliero e il 55,1% non ha mai donato il sangue. In riferimento alle motivazioni relative alla mancata effettuazione del test, il 64% degli intervistati afferma di non essere a rischio e il 47,9% di sentirsi in buona salute e di non avere alcun motivo di sospettare di essere sieropositivo. Infine, per quanto riguarda la percezione del rischio: il 47,3% si sente poco a rischio, il 26,7% non si sente per niente a rischio di infezione, il 9,1% si sente molto a rischio, mentre il rimanente 16,9% risponde non sa.

Conclusioni: Dai dati raccolti è interessante notare l'elevata percentuale di utenti giovani, che hanno incontri occasionali, si percepiscono poco o affatto a rischio e che non hanno mai effettuato un test HIV in quanto ritengono di non aver avuto comportamenti a rischio.

Contributo: 60F/A

L'IMPATTO DELL'INFEZIONE NELLE FAMIGLIE HIV POSITIVE MIGRANTI

Serenella Oletto* (*Dip. di Pediatria, Università degli Studi di Padova*); Barbara Ghiringhelli (*Cadr Fondazione ISMU, Milano*); Chiara Novello (*Fondazione Meschino, Milano*); Osvalda Rampon (*); Carlo Giaquinto (*)

Background: In ambito sanitario non pochi problemi ed interrogativi sorgono dinanzi a situazioni di persone provenienti da altre culture con differenti universi di valori e codici di comportamento etico e sociale. La presa in carico di genitori e bambini con infezione da HIV non può non tenere conto che porsi in modo non dialogante con l'appartenenza culturale, religiosa, ontologica della persona alza di molto la possibilità di fallimento della presa in carico del paziente. Ciò può tradursi in difficoltà di diagnosi, trattamento, organizzazione dell'assistenza socio-sanitaria ed è alla base dell'incremento di consulenze richieste al nostro centro da servizi pediatrici, ostetrici, sociali periferici. Il progetto si propone di:

- migliorare l'assistenza ai genitori HIV positivi ed ai minori sieropositivi stranieri (soprattutto romeni);
- ridurre lo scarto tra le aspettative del personale curante e quelle dei pazienti;
- favorire l'incontro tra realtà giuridiche e culturali estremamente differenti;
- comprendere i "perché" di comportamenti che sfuggono o si connotano di "non senso" se che adotta una lettura monoculturale (occidentale) e non si tiene conto dell'appartenenza "altra" del paziente.

Metodi: Parte 1. Un'intervista semi-strutturata somministrata a 30 madri sieropositive provenienti dall'Africa Occidentale, un'intervista semistrutturata con items simili (rivolta separatamente a 7 adolescenti romeni, ai loro genitori, al personale socio-educativo-sanitario curante) e due successivi incontri di discussione dei punti chiave delle interviste consentiranno l'approfondimento delle strategie attraverso cui i genitori ed i ragazzi immigrati affrontano e gestiscono l'infezione da HIV.

Parte 2. Quattro 'focus groups' (ognuno con 10-12 operatori pediatrici e materno-infantili, ospedalieri e territoriali del Veneto) rileveranno le problematiche emerse nel supporto alle famiglie immigrate con infezione da HIV e le "buone prassi" adottate. Una scheda compilata per ogni nucleo familiare migrante "sieropositivo" conosciuto dagli operatori costituirà strumento di controllo delle informazioni acquisite nei focus group.

Risultati: Parte 1. È stata preparata la traccia degli argomenti dell'intervista alle madri africane e quella per le interviste agli adolescenti romeni, ai loro genitori, al personale curante. Le interviste raccolgono elementi significativi di situazioni ed eventi nel rapporto persona-servizio sanitario; persona-HIV; persona-mondo degli affetti. "Cosa è accaduto? Perché è accaduto? Perché è accaduto a me? Perché ora? Quali sono le conseguenze? Cosa si deve e si può fare?" sono le principali aree per cogliere la percezione dei genitori e degli adolescenti con la loro situazione di "non salute". Al momento sono stati selezionati i partecipanti alla ricerca, è stato preparato il foglio di consenso informato, è in corso la fase di sperimentazione dell'intervista alle madri africane.

Parte 2. Un primo focus group con 12 assistenti sociali dei servizi del Veneto è organizzato per aprile. I successivi avranno luogo entro il 2005. È stata preparata una semplice scheda che rileva oltre ai dati socio-anagrafici di ogni nucleo familiare, i motivi della presa in carico, le difficoltà incontrate, le modalità di risoluzione delle problematiche, i bisogni rilevati a cui non è stato

Conclusioni: Il progetto è in fase di sviluppo e si è notato un grande interesse sia negli operatori socio-sanitari contattati che nei genitori coinvolti nella fase sperimentale delle interviste.

Contributo: 60F.8

DETERMINANTI DEL RITARDO DI DIAGNOSI DI INFEZIONE DA HIV

Anna Colucci* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Laura Camoni (*) ; Roberta Balzano** (*INMI L. Spallanzani, Roma*); Susanna Grisetti (**); Alessandro Sampaolesi (**); Loredana Cafaro*** (*Azienda Ospedaliera "D. Cotugno", Napoli*); Fabrizio Starace (***) ; Maria Stella Aloisi (*Ministero della Salute, Roma*); Patrizio Pezzotti (*ASP, Regione Lazio*); Giuseppe Ippolito (**); Enrico Girardi (**)

Background: Un'alta proporzione dei casi di AIDS diagnosticati negli ultimi anni riguardano persone che arrivano a conoscere il proprio stato sierologico per HIV solo al momento della comparsa di una patologia indicativa di AIDS o poco prima. Obiettivo di questo studio è valutare i fattori demografici, sociali, psicologici e comportamentali che si associano ad un ritardo di diagnosi di infezione da HIV.

Metodi: Studio prospettico multicentrico su persone con diagnosi incidente di AIDS. Al momento dell'arruolamento è proposto un questionario somministrato tramite un'intervista strutturata. Il questionario, proposto al paziente al momento della dimissione, è articolato in sette sezioni: dati anagrafici e clinici (a cura del medico intervistatore); dati sociodemografici; storia dell'infezione e del test; comportamenti a rischio e aderenza alle terapie antiretrovirali; informazioni-motivazioni-abilità comportamentali. Il questionario, inoltre, contiene due scale: il Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D) e il Social Readjustment Rating Scale (SRE) di Holmes e Rahe. Ai fini di questa analisi è stata definita come diagnosi HIV tardiva il tempo tra diagnosi HIV e diagnosi AIDS <6 mesi.

Risultati: I risultati qui riportati si riferiscono alle caratteristiche di 293 persone arruolate in 11 centri. Delle 293 persone arruolate, 148 hanno compilato l'intero questionario e di 145 persone è stato possibile raccogliere solo informazioni anagrafiche e cliniche. Il tempo mediano tra diagnosi HIV e diagnosi AIDS è risultato pari a 2 mesi. La percentuale di pazienti con diagnosi tardiva è pari al 56,3%. Delle 148 persone che hanno compilato l'intero questionario, 82 presentano una diagnosi tardiva. Una diagnosi tardiva è stata più frequente tra i maschi (57% vs 50% tra le femmine), tra i nati all'estero (68% vs 53% nei nati in Italia) e tra le persone contagiate per via sessuale (72% tra eterosessuali e 61% omosessuali vs 28% tra i tossicodipendenti) L'età mediana è leggermente più elevata tra pazienti con ritardo di diagnosi (42 vs 40,5 anni). Tra i pazienti che hanno riportato una diagnosi tardiva, 25 riferiscono una febbre (di durata superiore ad un mese) prima della diagnosi di HIV, 32 un forte dimagrimento (>10% in 1 mese), 14 una diagnosi di polmonite, 9 una diagnosi di sifilide, 7 di herpes zoster, 1 di tubercolosi.

Conclusioni: L'analisi evidenzia come spesso nonostante la presenza di sintomi clinici che suggeriscono una infezione da HIV si arrivi comunque a una diagnosi tardiva. Sono necessari ulteriori approfondimenti che permettano di definire quali fattori si associano al ritardo di diagnosi e dunque alla possibilità di diagnosi tempestive, facilitando così l'accesso alle terapie antiretrovirali.

Partecipanti allo studio: Ospedali Riuniti di Bergamo (BG) C. Arici, L. Ravasio - Università di Sassari Istituto di Malattie Infettive (SS) MS Mura, M. Cilliano - Policlinico di Modena (MO) V. Borghi - Ospedale S. Orsola (BO) F. Chiodo, V. Colangeli, T. Sebastiani - Ospedali Civili (BS) G. Carosi, F. Castelli, G. Paraninfo Ospedale Luigi Sacco (MI) A. D'Arminio Monforte, S. Melzi, F. Tordato - Ospedale A. Di Savoia (TO) G. Di Perri, D. Aguilar, L. Ladetto - Ospedale S. Anna (FE) L. Sighinolfi - Ospedale S. Maria Annunziata (FI) F. Mazzotta, S. Locaputo, M. Di Pietro - Policlinico di Bari (BA) J. Fiore, A. Favia, M.G. Tateo

Contributo: 60F.9

ADERENZA ALLA TERAPIA ANTIRETROVIRALE IN BAMBINI CON INFEZIONE DA HIV

F. Albano* (*Dip. di Pediatria, Università degli Studi di Napoli "Federico II"*); V. Giacomet ; E. Bruzzese (*); G. De Marco (*); C. Giaquinto (*Dip. di Pediatria, Università degli Studi di Padova*); C. Gabiano (*Università degli Studi di Torino*); A. Officioso; F. Storace (*Azienda Ospedaliera "D. Cotugno", Napoli*); A. Guarino (*)

Background: L'efficacia della terapia antiretrovirale (ART) è direttamente collegata ad un'aderenza ottimale. I tassi di non aderenza dipendono da numerose variabili. Nel corso del progetto per la valutazione dell'aderenza alla ART svolto in collaborazione con i centri del Registro Italiano per l'AIDS Pediatrico, è stata effettuata una valutazione trasversale in un campione di 129 bambini con infezione da HIV, attraverso la somministrazione di un questionario strutturato ai caregivers con riferimento ad omissioni di dosi di singoli farmaci antiretrovirali nei 4 giorni precedenti l'arruolamento. Circa il 20% dei pazienti evidenziava un tasso di aderenza subottimale (<95% delle dosi). Sono stati studiati i principali determinanti di aderenza. L'aderenza era significativamente migliore nei bambini che ricevevano la ART dai genitori adottivi rispetto a quelli che ricevevano la terapia dai genitori biologici. L'aderenza alla ART era minore nei bambini che erano a conoscenza del loro stato di infezione da HIV rispetto a quelli che non lo erano, e questo raggiungeva una significatività statistica quando si consideravano i bambini di età superiore a 8 anni. Non erano evidenziate differenze significative in relazione all'età e alle condizioni cliniche. Obiettivi. Valutare longitudinalmente l'aderenza alla ART e i suoi determinanti.

Metodi: Lo stesso questionario è stato somministrato a distanza di 12 mesi a 112 (87%) dei 129 caregivers.

Risultati: A distanza di 1 anno la percentuale di non aderenza è risultata quantitativamente stabile (19/112, 17%). Tuttavia è stata osservata una notevole modificazione del pattern di aderenza: dei 19 non aderenti, 9 sono risultati nuovi non aderenti, mentre 9 pazienti non aderenti alla prima intervista sono risultati aderenti. L'aderenza era significativamente migliore nei bambini che ricevevano la ART dai genitori adottivi rispetto a quelli che ricevevano la terapia dai genitori biologici e a quelli che si autosomministravano la terapia. Una addizionale, sebbene indiretta, informazione a sostegno della correlazione tra aderenza e gestione della terapia è stato il riscontro di una carica virale indosabile in 18 dei 32 bambini (56%) che ricevevano la ART dagli affidatari rispetto ai 20 di 62 bambini (22%) che ricevevano la terapia dai genitori e ai 4 di 18 bambini (22%) che erano autosomministratori ($p < 0.02$). Una correlazione statisticamente significativa è stata osservata tra aderenza e numero giornaliero di dosi assunte dal bambino. I bambini che ricevevano più di 6 dosi/giorno erano più aderenti di quelli che ne ricevevano meno. L'aderenza è stata analizzata in relazione al tipo di farmaco, con sostanziali differenze tra i diversi farmaci. La prevalenza di shift di terapia nel gruppo dei bambini aderenti e in quelli non aderenti, era significativamente maggiore nel gruppo dei non aderenti, suggerendo indirettamente un'associazione tra non aderenza e failure della terapia.

Conclusioni: I dati indicano che l'aderenza è un fenomeno stabile ma dinamico. L'aderenza non è modificata da variabili demografiche e cliniche del bambino ma è direttamente collegata all'adulto responsabile della terapia. Il raggiungimento di una maggiore accettazione e assunzione di responsabilità nei confronti del proprio stato di malattia da parte dei bambini più grandi è fondamentale per garantire una maggiore aderenza alle prescrizioni mediche. Questi dati forniscono il presupposto logico per la necessità di interventi formativi specifici nelle famiglie di bambini sieropositivi e negli stessi bambini allo scopo di ottimizzare l'aderenza alla terapia.

Contributo: 60F.10

I BISOGNI DI SALUTE DEI CITTADINI STRANIERI IN MERITO ALL'INFEZIONE DA HIV/AIDS

Anna Maria Luzi* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); Anna Colucci (*); Pietro Gallo (*); Issa El Hamad (*Spedali Civili di Brescia*); Vincenzo Vullo (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); Tullio Prestileo (*Ospedali Casa del Sole e Pisani, Palermo*); Rudi Valli (*); Anna D'Agostini (*)

Background: In Italia, il Centro Operativo AIDS dell'Istituto Superiore di Sanità ha rilevato un aumento della proporzione di casi cumulativi di AIDS notificati in cittadini stranieri (dal 4,5% nel 1994-95 al 14,8% nel 2002-03). Tuttavia, non ci sono elementi che indichino la reale diffusione dell'infezione da HIV nella popolazione immigrata presente in Italia. Il trend in crescita delle diagnosi di AIDS, registrato nell'ultimo decennio, potrebbe essere determinato, tra le altre cause, da un aumento della popolazione straniera (oltre 2 milioni alla fine del 2003 con regolare permesso di soggiorno - Ministero dell'Interno) e da una maggiore difficoltà per la persona immigrata ad effettuare il test e ad usufruire delle terapie antiretrovirali: il 68,8% degli stranieri, ha effettuato il primo test HIV con esito positivo nei sei mesi precedenti la diagnosi di AIDS (Not Ist Super Sanità 2004; 17(10) suppl.1). Tali evidenze inducono a riflettere sulla necessità di migliorare l'accesso e la fruibilità dei servizi di prevenzione e cura per le popolazioni straniere.

Metodi: Obiettivo generale: Sviluppare programmi di prevenzione volti ad individuare i bisogni di salute dei cittadini stranieri in merito all'infezione da HIV/AIDS e facilitarne l'accesso e la fruibilità alle strutture psico-socio-sanitarie governative e non.

Obiettivi specifici: Confrontare le strategie di intervento più efficaci messe in atto in aree geografiche del Nord, del Centro e del Sud Italia.

- Individuare buone prassi per l'attuazione di programmi di prevenzione ed intervento a tutela della salute del cittadino straniero.
- Sensibilizzare gli operatori alla relazione interculturale, attraverso seminari monotematici.
- Attivare Focus Group in tre poli (Brescia, Roma, Palermo) con la partecipazione di diverse figure professionali. Per raggiungere tali obiettivi lo studio prevede:
 - aggiornamento della banca dati, acquisita in studi precedenti, per rilevare quali interventi siano stati realizzati a favore della tutela della salute dei cittadini stranieri sul territorio nazionale;
 - attivazione di Focus Group in tre poli: Roma, Brescia, Palermo con la partecipazione di equipe multidisciplinari impegnate con le popolazioni migranti, al fine di individuare strategie di intervento mirate a facilitare i cittadini stranieri con problematiche legate all'infezione da HIV/AIDS nella fruizione dei servizi disponibili sul territorio. Sono stati previsti tre incontri seminariali e un meeting conclusivo.

Risultati: La realizzazione di un primo seminario (17/11/04) ha permesso di individuare in differenti aree geografiche italiane gli interventi di strutture pubbliche e non, rivolti alle popolazioni migranti con problematiche legate all'infezione da HIV/AIDS. È stata, inoltre, aggiornata la banca dati delle strutture alle quali afferiscono persone straniere, individuando 189 Centri Pubblici e 28 Associazioni di Volontariato/ONG. In un secondo seminario (1/03/05) è stato affrontato il tema dei bisogni di salute delle popolazioni migranti rilevando la necessità di individuare le caratteristiche cliniche, epidemiologiche, psicosociali, comportamentali e culturali delle persone non italiane con infezione da HIV.

Conclusioni: La fase iniziale dello studio ha evidenziato la necessità per gli operatori impegnati con le popolazioni migranti di elaborare pratiche condivise, efficaci ed appropriate in materia di prevenzione e cura dell'infezione da HIV/AIDS.

Contributo: 60F/B

BAMBINI E ADOLESCENTI SIEROPOSITIVI: RICERCA SU MODALITÀ E TECNICHE DI COMUNICAZIONE DELLA DIAGNOSI DEFINIZIONE E SPERIMENTAZIONE DI UN PROTOCOLLO D'INTERVENTO A SOSTEGNO DELL'ACCETTABILITÀ E DELL'ELABORAZIONE DELLA DIAGNOSI DI SIEROPOSITIVITÀ RIVOLTO A MINORI SIEROPOSITIVI E ALLE LORO FAMIGLIE

Mauro Emilio Moroni (*GVMAS, Gruppo di Volontariato per Minori e Adulti Sieropositivi*)

Background: La ricerca - intervento ha preso dall'esigenza di offrire un supporto alle famiglie dei bambini e degli adolescenti sieropositivi relativamente alla comunicazione della diagnosi di sieropositività, problema sentito come particolarmente difficile e psicologicamente gravoso, soprattutto con l'approssimarsi della pubertà e dell'adolescenza. Il Gruppo di Volontariato per Minori e Adulti Sieropositivi, l'Associazione ANLAIDS Lombardia, la Prima Clinica Pediatrica De Marchi dell'Università degli Studi di Milano, l'Istituto Minotauro di Milano hanno costituito un'équipe di lavoro, che opera sia nel day hospital della clinica pediatrica, presso il quale vengono seguiti i minori, sia nella sede del gruppo di Volontariato per minori e adulti sieropositivi e di Anlaids Lombardia, di Milano. Gli obiettivi del lavoro sono:

- fornire un supporto sia ai minori sieropositivi sia alle famiglie, attraverso l'offerta di uno spazio di counseling psicologico, specificamente mirato all'accompagnamento, a partire dalle differenti situazioni cliniche, nel processo di comunicazione ed elaborazione della diagnosi. Allo spazio di ascolto psicologico accedono attualmente i pazienti adolescenti e i familiari, sia su richiesta spontanea, sia su invio o indicazione da parte di medici;
- affrontare i problemi incontrati dagli operatori, medici, assistenti sociali, volontari, nel rapporto con i pazienti, mediante la discussione di casi. Vengono affrontate, sia individualmente che negli incontri di équipe, soprattutto tematiche legate all'adesione del paziente e dei familiari alle terapie proposte, e alla gestione, da parte degli operatori, soprattutto volontari, del rapporto educativo con i bambini e ragazzi;
- comprendere meglio le caratteristiche della comunicazione della diagnosi di HIV, prendendo in considerazione in particolare la relazione esistente fra malattia e contesto affettivo di appartenenza, al fine di individuare la strategia più corretta di risposta alle richieste poste dai minori sia ai propri familiari che agli operatori di riferimento;
- offrire agli adolescenti sieropositivi, che hanno già raggiunto consapevolezza della propria condizione, uno spazio di scambio, e di elaborazione in gruppo dei problemi legati alla malattia. Il gruppo dei pari è una risorsa importante da utilizzare, poiché rappresenta, in questa fascia d'età, un contesto di riferimento e di rispecchiamento molto significativo. Appare infatti importante creare le condizioni per superare il "segreto", sperimentando le possibilità di comunicazione in un contesto comunque protetto, dove può risultare possibile condividere problemi e pensieri. L'équipe sta quindi strutturando un lavoro di gruppo, che prevede una serie di incontri, coordinati dagli operatori, in cui i ragazzi possano incontrarsi e mettere in comune e confrontare le proprie esperienze e le principali difficoltà che incontrano rispetto alla sieropositività.

Contributo: 60F.12

INDAGINE SUI RISCHI CONSAPEVOLI NEI COMPORTAMENTI SESSUALI DELLA POPOLAZIONE MSM (FASE PRELIMINARE)

Pierluigi Pezzotta* (*IPSE Istituto Psicologico Europeo*); Angela Oliveri (*); Massimo Oldrini** (*LILA Onlus, Milano*); Maria Luisa Cosmaro (**)

Background: Dato l'incremento registrato negli ultimi anni nella diffusione di infezioni a trasmissione sessuale (ITS) e il numero crescente di nuove infezioni da HIV tra i MSM italiani, obiettivo della ricerca è indagare le motivazioni che portano tale fascia di popolazione alla scelta consapevole di comportamenti sessuali a rischio. La fase preliminare di ricerca (dic 04/gen 05) ha previsto l'analisi di studi analoghi già realizzati in altri Paesi europei (cfr. bibliografia di documento presentazione progetto) che hanno registrato lo stesso trend negativo. Collaborano alla ricerca - di cui la sede milanese di LILA Lega Italiana per la Lotta contro l'AIDS è titolare, e IPSE Istituto Psicologico Europeo è responsabile scientifico - CIG Arcigay Milano e Circolo C.O. Mario Mieli Roma.

Metodi: La metodologia utilizzata è di tipo integrato: a)indagine qualitativa, per indagare le motivazioni profonde dell'accettazione di pratiche sessuali a rischio; b)indagine quantitativa, per validare estensivamente i risultati di a). L'indagine qualitativa ha previsto 20 colloqui in profondità con soggetti MSM che adottano comportamenti sessuali a rischio (penetrazione senza condom). Il campione è costituito da individui residenti a Milano, Roma e Torino nella fascia 18-55 anni, di cui il 30% in relazione di coppia stabile; 33% HIV+, 33% HIV-, 33% non si è mai sottoposta al test. La scelta delle variabili di segmentazione è realizzata sulla base di maggiore o minore influenza sui comportamenti sessuali. Attività realizzate in tale fase (feb/mar '05): stesura traccia di conduzione intervista; reperimento intervistati; conduzione interviste a opera di esperti in *counselling* e psicologi; analisi risultati. L'indagine quantitativa si basa sui risultati di tale analisi e consiste nella somministrazione di un questionario semi-strutturato (domande chiuse e aperte). Il reperimento degli soggetti cui verrà somministrato sarà effettuato sul territorio nazionale attraverso le sedi LILA e Arcigay, e Circolo C.O. Mario Mieli. Sarà inoltre possibile la compilazione sui siti delle organizzazioni partecipanti. Numero minimo di questionari necessari alla lettura dei risultati in modo disaggregato (3 aree geografiche, 3 classi di età, 3 livelli di istruzione...): 300. Il campione sarà segmentato per le principali variabili demografiche, così da rappresentare adeguatamente tutti i segmenti della popolazione MSM. Attività previste nella fase (apr/giu 05): somministrazione questionari; controllo qualità; codifica domande aperte; cleaning; analisi risultati; redazione report su risultati indagine.

Risultati: L'analisi delle motivazioni profonde causa di adozione di comportamenti a rischio risultanti dai questionari sarà discussa dal gruppo progetto IPSE, LILA, Arcigay, Mario Mieli, per l'individuazione di strategie comunicative mirate alla diminuzione di tali pratiche (set 05). Saranno individuate parole chiave per l'elaborazione di messaggi atti a stimolare riflessioni sul concetto di salute sessuale, anche attraverso l'utilizzo di strategie di "riduzione dei rischi" laddove si ritenesse necessario superare il concetto tradizionale di "safer sex" in quanto non più efficace nel contenimento delle ITS.

Conclusioni: La parte conclusiva della ricerca (ott/nov 05) prevederà l'identificazione del mezzo comunicativo ritenuto più idoneo alla diffusione dei messaggi elaborati, che sarà sottoposto all'attenzione dell'ISS come parte integrante della relazione finale di ricerca.

Contributo: 60F.14

PREVENZIONE E CURA DELLE TOSSICODIPENDENZE IN ALBANIA

N. Schinaia* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); L. Avellis (*); C. Bumbaca (*); I. Itro (*); Y. Kodra (*); M. Figliomeni (*); G. Rezza (*); E. Dragoti** (*ISOP*); Z. Sulaj (*ISP*); F. Todhri (**); F. Fuda (*Chi Onlus*)

Background: L'uso di sostanze psicoattive appare in Albania solo all'inizio degli anni '90, in coincidenza con la caduta del vecchio regime socialista e la susseguente situazione di instabilità socio-economica ha favorito un rapido sviluppo del fenomeno. Non esistono dati certi riguardo alla popolazione dei tossicodipendenti, perché vi è ancora una situazione di marginalità sociale e di stigma e perché le strutture socio-sanitarie sono ancora impreparate quantitativamente e qualitativamente ad affrontare tale problema. Dati recenti indicano un aumento dei consumatori di eroina per via intravenosa, fenomeno che potrebbe preludere a una diffusione del virus HIV+ tra gli eroinomani. L'Albania viene correntemente indicata come paese di transito della droga, ma vi sono indicazioni che sta entrando nel paese anche per il consumo locale. Il presente progetto mira a creare un programma pilota di prevenzione e riduzione del danno, inclusa un'attività di assistenza psicosociale, che possano rispondere ai bisogni del tossicodipendente HIV+. Le attività di assistenza ai tossicodipendenti sono state avviate sulla base dell'urgenza del problema, ma sembra necessaria una valutazione dell'attitudine degli operatori, per migliorarne l'impatto. In questo lavoro vengono presentati i risultati iniziali del progetto riguardo un'indagine di sieroprevalenza in alcuni gruppi di tossicodipendenti e la valutazione attraverso un'indagine qualitativa della situazione attuale di cinque strutture che si occupano di tossicodipendenza, quanto a conoscenze, comportamenti ed attitudini degli operatori che vi operano.

Metodi: Per la raccolta dati è stato compilato un questionario, i dati archiviati elettronicamente con il database ACCESS e analizzati mediante il software EPI 2000 da parte dell'Istituto di Sanità Pubblica di Tirana, con la supervisione/collaborazione di ISS. Verranno calcolate medie e proporzioni di variabili quantitative e qualitative e verranno usati gli appropriati test statistici per valutare la significatività statistica di eventuali differenze fra medie e proporzioni, mediante rispettivamente i test t di Student e chi quadrato. Si è scelto di svolgere un'indagine qualitativa con interviste semi-strutturate da rivolgere a operatori che lavorano nelle strutture.

Risultati: In totale sono stati testati 137 campioni di sangue (70 nel 2003 e 67 nel 2004). Riguardo alle norme del comportamento sessuale si nota una mancanza di conoscenze legate ai rapporti sessuali protetti. Inoltre, l'uso del condom non è stato considerato accettabile nelle relazioni di lunga durata. Non sono stati rilevati casi HIV+.

Conclusioni: La prevenzione (modelli di informazione, interventi mirati su gruppi di popolazioni con comportamenti a rischio, "counseling" individuale) e le problematiche assistenziali rappresentano i temi di maggior rilevanza. Il Progetto prevede il finanziamento di sperimentazioni ed interventi che hanno la finalità di raggiungere risultati direttamente trasferibili alle realtà del Paese o di migliorare il livello assistenziale per i soggetti con infezione da HIV e la loro qualità di vita. Gli ambiti di intervento sono stati individuati con l'obiettivo di migliorare la conoscenza su problemi specifici e di fornire risposte nei confronti di soggetti, comportamenti e singole situazioni. La contiguità fra Italia e Albania e l'esperienza italiana che data da più tempo rappresentano da un lato un fattore di interscambio di droga o tossicodipendenti fra i due paesi e al tempo stesso un importante esempio di programmi non più solo nazionali ma sempre più integrati a livello europeo.

Contributo: 60F/C

INDAGINE SU CONOSCENZE, ATTITUDINI E COMPORTAMENTI SESSUALI IN RELAZIONE ALL'HIV E ALLE ALTRE MALATTIE A TRASMISSIONE SESSUALE

Carlo Signorelli* (*Università degli Studi di Parma*); Cesira Pasquarella (*) ; Edoardo Colzani (*Università Bicocca, Milano*); Mila Fanti (*)

Background: Scopo della ricerca è stato quello di monitorare conoscenze, attitudini e comportamenti sessuali nella popolazione generale e di valutare gli effetti delle più recenti campagne informative-educative sull'HIV/AIDS sulla modifica di tali comportamenti. La scelta di coinvolgere la popolazione generale è stata determinata non solo dalla già nutrita presenza in letteratura di studi sui comportamenti e sugli interventi preventivi nei gruppi a maggior rischio, ma anche dalla necessità di orientare l'attenzione sui comportamenti a rischio piuttosto che sulle categorie a rischio. Lo studio si è inoltre proposto di stimare la prevalenza di MST e di descrivere le caratteristiche di chi ha avuto almeno una di queste malattie nella vita.

Metodi: Il campionamento, per quote considerando sesso, fascia d'età e titolo di studio, ha coinvolto quattro province italiane (Milano, Parma, Perugia, Bari). A 2000 soggetti di età compresa tra i 18 e i 49 anni è stato somministrato un questionario che ha ricalcato quello utilizzato in indagini simili dallo stesso Gruppo di ricerca e da altri a livello internazionale. Attraverso il programma statistico SPSS è stata condotta l'analisi dei dati inclusa una regressione logistica multipla per identificare i possibili determinanti dei comportamenti sessuali a rischio. Un secondo modello è stato costruito per valutare i possibili fattori associati alle MST.

Risultati: I messaggi pubblicitari televisivi o radiofonici risultano la fonte d'informazione più citata (76,7% del campione). Il 40,1% dei soggetti ha avuto comportamenti sessuali a rischio. Il 47,5% ritiene che il proprio rischio di contrarre l'infezione per via sessuale sia nullo; il 7,5% ritiene tale rischio alto. La regressione logistica fa emergere un'associazione significativa tra il comportamento sessuale a rischio e il sesso maschile (OR=6,2; LC95% 4,9-7,7), il ricevere informazioni sull'AIDS attraverso libri (OR=1,4; LC95% 1,1-1,8), amici (OR=1,4; LC95% 1,1-1,8) e l'aver avuto il primo rapporto sessuale prima dei 18 anni (OR=2,1; LC95% 1,6-2,6). L'essere domiciliato al nord (OR=0,7; LC95% 0,5-0,9) e aver ricevuto informazioni dalla propria famiglia (OR=0,7; LC95% 0,5-0,9) risultano elementi protettivi. Il 9,3% dei soggetti ha dichiarato di aver avuto almeno una MST negli ultimi 5 anni. Di questi, il 53,8% sono maschi; il 42,8% è nella fascia d'età 40-49 anni. Per i maschi le percentuali più alte si ritrovano fra chi vive al Nord, chi non ha alcun titolo di studio ed è single; per le femmine, tra chi vive al Sud, chi è sposata e laureata. L'età media del primo rapporto in chi ha avuto MST è 17,5 anni (18,2 in chi non le ha avute). Questi soggetti hanno avuto un solo partner negli ultimi 5 anni. Il 31,7% ha effettuato il test per l'HIV una volta, il 34,5% più di una volta. Le patologie più segnalate sono i condilomi acuminati e le infezioni da Clamidia. La prevalenza delle MST è risultata del 63,3% tra i tossicodipendenti e del 25,5% fra gli omosessuali.

Conclusioni: Al di là di una serie di considerazioni sulle conoscenze e sui comportamenti, già poste in una precedente nota, questi risultati confermano che l'aver comportamenti sessuali a rischio è un fattore associato significativamente all'insorgenza di MST. Questi soggetti si sottopongono maggiormente al test per l'HIV rispetto a chi non ha mai avuto MST. Come in studi precedenti le MST vengono riportate maggiormente da uomini con livello di educazione inferiore e da donne con titolo di studio più alto.

Contributo: 60F.15

COMPORAMENTI A RISCHIO E PREVENZIONE DELL'INFEZIONE DA HIV: VALUTAZIONE DI UNA RICERCA-INTERVENTO DI *PEER EDUCATION*

C. Simonelli (*Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*); F. M. Tripodi; C. Silvaggi (*Istituto di Sessuologia Clinica*)

Background: La ricerca propone un'indagine descrittiva sui comportamenti a rischio nella popolazione giovanile e la valutazione di una metodologia d'intervento basata sulla *peer education* nel campo della prevenzione dell'infezione da HIV. La *peer education* consiste in una metodologia d'intervento di educazione alla salute rivolta ai giovani, basata sul loro coinvolgimento diretto. Tale modello prevede che un gruppo di adolescenti si assuma la responsabilità di diventare opinion leader e che promuova, con la supervisione degli esperti, iniziative di sensibilizzazione, informazione e orientamento dei coetanei rispetto al tema prescelto.

Metodi: L'intervento si compone di tre fasi principali: I fase: •proposta di lavoro ai soggetti istituzionali e selezione delle scuole in cui operare; •somministrazione del pre-test che coinvolgerà l'intera popolazione studentesca di ogni Istituto Scolastico, con l'obiettivo di raccogliere dati sui comportamenti a rischio, con particolare riferimento a quelli relativi all'infezione da HIV; •lancio della proposta di lavoro a tutti i ragazzi della fascia target (terze classi), all'interno dei quali saranno selezionati i peer educator. II fase: •costituzione del gruppo dei peer educator come gruppo di lavoro e formazione degli stessi sul tema di pertinenza del progetto. III fase: •realizzazione delle iniziative progettate dai peer educator nelle classi sperimentali; i destinatari degli interventi a cascata saranno gli studenti delle seconde classi divisi in due gruppi: Gruppo Sperimentale (GS) e Gruppo di Controllo (GC); •somministrazione del post test al gruppo dei peer educator, al GS e al GC; •somministrazione degli strumenti di valutazione in un follow-up a tre mesi ai peer educator al GS e al GC per verificare il mantenimento/decadimento delle competenze acquisite. Per l'aspetto valutativo sono stati utilizzati i seguenti strumenti: 1. Questionario di nostra costruzione che rivela i dati socio-anagrafici, il livello di informazione relativo all'infezione da HIV, la percezione del rischio ed i comportamenti ad esso correlati. 2. Scala relativa alle credenze sulla prevenzione dell'HIV (Koopman, 1990) 3. Scala dell'autoefficacia regolatoria (Caprara, 2001).

Risultati: La prima delle 3 fasi in cui si articola il progetto è stata portata a termine. Nello specifico, sono state selezionate 4 scuole medie superiori appartenenti al IV e al XII municipio del territorio romano, per un totale di 2665 studenti. È stata effettuata la prima somministrazione dello strumento valutativo (pre-test) a tutta la popolazione studentesca, inoltre, sono stati selezionati un totale di 52 peer educator, costituendo così, in ogni Istituto, un gruppo di numerosità variabile tra gli 8 e i 20 ragazzi. La seconda fase della ricerca ha avuto inizio ed è tuttora in corso: in tutte le scuole è stato attivato l'intervento formativo a carattere teorico-esperienziale rivolto ai gruppi di peer educator. Il corso, tenuto da psicologi esperti nel settore, prevede 6 incontri a cadenza settimanale per un totale di 15 ore.

Conclusioni: La metodologia della *peer education* consente di attuare un cambiamento comportamentale utilizzando le risorse del gruppo dei pari in grado di influenzare gli adolescenti nella costruzione della propria identità e negli atteggiamenti relativi alla tutela della propria salute. È auspicabile che gli opinion leader così formati promuovano, all'interno del contesto scolastico di appartenenza, con il sostegno delle figure adulte, iniziative rivolte ai pari relative al tema della prevenzione dell'infezione da HIV anche negli anni successivi alla chiusura di questo lavoro.

Contributo: 60F.16

SMI-HIV: STUDIO SUL RISCHIO DI INFEZIONE DA HIV IN SOGGETTI CON PATOLOGIE PSICHIATRICHE GRAVI

Giuseppe Nardini* (*Azienda Ospedaliera "D. Cotugno", Napoli*); Giuseppe Viparelli (*); Loredana Cafaro (*); Attilio Vergone (*); Fabrizio Starace (*)

Background: In letteratura la prevalenza di infezione da HIV risulta essere significativamente più alta in soggetti con gravi patologie psichiatriche-Severe Mental Illness (SMI), quali la schizofrenia, il disturbo bipolare e altre psicopatologie, rispetto alla prevalenza registrata nella popolazione generale. Ricerche specifiche indicano che, in presenza di SMI, la probabilità di contrarre l'infezione da HIV è sensibilmente più alta e un incremento dell'attività sessuale non protetta si associa con la gravità della psicopatologia. In individui con SMI, l'abuso di sostanze per via iniettiva è uno dei principali fattori di rischio. L'assumere stupefacenti può aumentare il pericolo di infezione attraverso eventuali rapporti sessuali con partner ad alto rischio di sieropositività. In letteratura, inoltre, si è evidenziato che un'alta percentuale di homeless, con SMI, assume comportamenti ad alto rischio, relativi sia all'abuso di sostanze che alle pratiche sessuali non protette con partner casuali. È stato dimostrato, infine, che interventi di tipo cognitivo-comportamentale focalizzati specificamente sull'infezione da HIV sono più efficaci di altri dello stesso tipo ma volti all'informazione relativa allo stato generale di salute. È attualmente in corso la prima fase di uno studio nazionale multicentrico che si propone quanto segue:

1. valutare la frequenza di comportamenti a rischio per infezione da HIV (sessuali e di assunzione di sostanze di abuso per via iniettiva) in un campione rappresentativo dei soggetti affetti da patologie psichiatriche gravi
2. definire, sulla base delle informazioni desunte, un programma di prevenzione ad hoc da applicare in questa popolazione. Nello specifico, saranno valutati la frequenza dei comportamenti a rischio di infezione per HIV in soggetti con SMI nonché i fattori favorevoli all'assunzione di comportamenti preventivi.

Metodi: Lo studio, di tipo multicentrico, prevede il reclutamento di soggetti affetti da SMI, consecutivamente afferenti presso Servizi Psichiatrici di Diagnosi e Cura che si trovino nell'ambito di aree geografiche con differente prevalenza di infezione da HIV a livello di popolazione generale. La metodica di rilevazione adottata nella ricerca si avvale di strumenti di tipo quantitativo, la cui redazione e messa a punto sono state curate, in questa prima fase attuativa del progetto, in base alla letteratura disponibile in materia nonché agli strumenti già routinariamente adoperati presso il Centro proponente.

Risultati: La prima fase di svolgimento dello studio ha visto la redazione e verifica dell'accettabilità (svoltasi su pazienti non arruolabili nello studio) degli strumenti di rilevazione di seguito citati:

- Questionario per la rilevazione dei dati di tipo socio-demografico, clinico, anamnestico
- Questionario sui comportamenti a rischio già adoperato nell'ambito dello Studio Italiano Multicentrico sugli aspetti neuropsicologici dell'infezione da HIV.
- Scala di valutazione psicopatologica globale, realizzata ponendo particolare attenzione sugli aspetti relativi alla formulazione degli item, al fine di evitare genericità o ambiguità. I livelli di gravità risultano descritti dettagliatamente.

Conclusioni: La migliore conoscenza dell'associazione dei disturbi psichiatrici con l'assunzione ed il mantenimento di comportamenti a rischio per l'infezione da HIV, fornirà ai Servizi che hanno in carico questo tipo di pazienti, degli elementi validi all'elaborazione di modalità di intervento appropriate per lo sviluppo ed il mantenimento di attitudini preventive e per favorire l'adozione di comportamenti di salute.

Contributo: 60F.18

SESSUALITÀ, GENITORIALITÀ, RELAZIONI AFFETTIVE NELLA COPPIA ETEROSESSUALE CON HIV

Giuseppe Nardini* (*Azienda Ospedaliera "D. Cotugno", Napoli*); Alberto Vito (*); Giuseppe Viparelli (*); Antonietta Mariniello (*); Fabrizio Starace (*)

Background: Evidenze scientifiche documentano l'importanza che i fattori relazionali rivestono nella prevenzione e nell'assistenza alla persona HIV+. L'infezione da HIV ha una declinazione comportamentale e relazionale per eccellenza, in quanto spesso si diffonde nell'ambito della relazione sessuale. Inoltre è nell'acquisizione e nel mantenimento di comportamenti – da gestire necessariamente all'interno di una coppia - che essa si previene e/o si cura. D'altra parte, la persona sieropositiva, al pari dell'individuo sano, ha una forte necessità di mantenere esperienze che - come la sessualità - contribuiscono alla determinazione della qualità della vita. L'esistenza di nuclei relazionali stabili (coppia, famiglia) svolge una forte azione di sostegno verso l'accettazione della malattia, l'adozione di pratiche di sesso sicuro, l'adesione alle terapie mediche.

Metodi: Lo studio si avvale di metodiche di ricerca qualitativa e quantitativa. Indagine qualitativa: a tutte le coppie (sierococondanti e sierodiscordanti) sarà somministrata un'intervista semistrutturata. Indagine quantitativa:

- Alle coppie (sierococondanti e sierodiscordanti) sarà somministrata la Dyadic Adjustment Scale (Spanier, 1976; versione italiana di Gentili *et al.*, 2002).
- Tutti i soggetti saranno sottoposti all'Index Sexual Satisfaction.
- In entrambi i componenti della coppia e nei soggetti single sarà indagata la prevalenza di disturbi psichici attraverso la Self Rating Depression Scale e la Self Rating Anxiety Scale.
- A tutti i soggetti, indifferentemente rispetto allo stato sierologico, sarà somministrato il Questionario sui Comportamenti Sessuali dal quale si ricaverà un indice dell'uso di misure per la prevenzione delle infezioni sessualmente trasmesse.
- Ai soggetti sieropositivi per HIV sarà sottoposta una scheda di screening per la valutazione dell'aderenza terapeutica.

Risultati: Nella prima fase è stata approfondita la redazione dell'intervista semistrutturata, comprendente sei aree tematiche: storia del rapporto, desiderio di genitorialità, sessualità, adattamento, comunicazione, coesione. Esse vertono sull'identificazione delle dinamiche decisionali di coppia, sulle strategie relazionali in materia di maternità/paternità, sessualità e pratiche preventive/contraccettive ed infine sull'aderenza terapeutica. L'intervista è stata costruita da psicologi e psichiatri esperti nella valutazione degli aspetti psicologici nei soggetti HIV+. Presso il Servizio Psichiatria di Consultazione dell'A.O.Cotugno di Napoli è stato condotto uno studio pilota allo scopo di valutare i processi decisionali in materia di riproduzione e adesione alle norme profilattiche e alle cure mediche. I risultati emersi sono stati considerati quali indicatori per l'estensione dello studio su scala nazionale.

Conclusioni: Appare di estrema importanza comprendere le caratteristiche del processo interattivo all'interno della relazione di coppia, HIV discordante o concordante, su temi quali la sessualità, il desiderio di genitorialità, l'aderenza terapeutica e definirne i fattori associati. La trasferibilità di queste conoscenze consentirà di identificare, definire e perfezionare modelli psicologici di sostegno destinati alla persona HIV+, centrati su un approccio relazionale e di coppia.

Contributo: 60F.19

STUDIO SUI COMPORTAMENTI A RISCHIO DELLE PERSONE HIV POSITIVE

B. Suligoï* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); L. Camoni (*) ; A. Colucci (*) ; A. Sinicco** (*Malattie Infettive, Università degli Studi di Torino*); I. Dal Conte (**); L. Veronese (**); A. Cargnel*** (*Ospedale L. Sacco, Milano*); R. Beretta (***) ; L. Cordier (***) ; G. Pastore° (*Malattie Infettive, Università degli Studi di Bari*); J. Fiore (°); M. Tateo (°); M. Affronti§ (*Amb. Med. Viaggi*); G. Cassarà (§); D. Carrillo (§)

Background: L'introduzione delle nuove terapie antiretrovirali ha portato ad un aumento del numero delle persone che vivono con la malattia e che costituiscono un potenziale serbatoio per la riattivazione dell'epidemia se non adottano comportamenti sicuri. I dati delle regioni/provincie italiane dove è attivo un sistema di sorveglianza HIV indicano un rallentamento dell'epidemia principalmente attribuibile al decremento dei casi fra persone che dichiarano come fattore di trasmissione l'uso di siringhe non sterili per l'iniezione di droghe endovena. Si osserva, invece, un aumento relativo alle persone che riferiscono contatti eterosessuali, che rappresentano in questi ultimi anni, la modalità di trasmissione più frequente. In Italia, e non solo, è stata osservata un'elevata proporzione di soggetti HIV-positivi di vecchia data tra pazienti con malattie a trasmissione sessuale (MST), il che suggerisce che una quota di persone sieropositive si espone comunque a rapporti sessuali non protetti (come testimoniato dall'acquisizione della MST) pur conoscendo il proprio sierostato. Obiettivo generale di questo studio è identificare e descrivere i comportamenti delle persone HIV positive per valutare quelli a rischio e stimare gli effetti sull'espansione futura dell'epidemia da HIV in Italia.

Metodi: Popolazione in studio: persone sieropositive da almeno 2 anni reclutate in 5 centri clinici (Milano, Torino, Roma, Palermo e Bari). Dimensione del campione prevista: 500 persone. Nella fase iniziale dello studio è stato preparato un questionario, in collaborazione con i referenti dei centri coinvolti, in modo da ottenere uno strumento condiviso e rispondente alle singole realtà. Successivamente è stato condotto lo studio pilota. Il questionario è anonimo ed è costituito da 24 item. Oltre a dati anagrafici e clinici, si raccolgono informazioni sul comportamento sessuale e sull'uso di droghe prima e dopo la diagnosi di HIV, sulle motivazioni che portano a non usare il profilattico e sulla percezione del rischio. La raccolta dei dati è iniziata a gennaio 2005.

Risultati: I dati preliminari sono relativi a 63 questionari. Il 66,7% dei soggetti reclutati è di sesso maschile ed ha un'età media di 38,8 anni. Il 47,3% del nostro campione ha contratto l'infezione da HIV prima del 1995. Le modalità di trasmissione più frequenti sono: rapporti eterosessuali (44,4%), rapporti omo-bisessuali (33,4%) e tossicodipendenza (20,6%). Il 54% del campione dichiara di aver assunto sostanze stupefacenti, di questi il 10,2% scambia siringhe. L'85% dichiara di avere una relazione stabile, tra questi il 21,2% non usa mai il profilattico nel rapporto vaginale, il 29,4% nel rapporto anale e il 62,5% nel rapporto orogenitale. Il 69,4% ha relazioni occasionali, tra questi il 9,5% non usa il profilattico nel rapporto vaginale, il 13,7% nel rapporto anale e il 51,7% nel rapporto orogenitale. La motivazione principale che spinge a non usare il profilattico riguarda per il 34,4% il bisogno di condivisione con il partner.

Conclusioni: I risultati preliminari evidenziano come malgrado le persone intervistate sappiano di essere sieropositive da molto tempo (quasi la metà conosce il suo sierostato da almeno 10 anni) adottano comunque comportamenti a rischio soprattutto nell'area sessuale. I rapporti anali e i rapporti orogenitali sono in proporzione i rapporti nei quali si usa di meno il profilattico. Tali risultati anche se parziali rappresentano informazioni preziose per predisporre interventi di prevenzione a tutela della salute della persona HIV positiva.

Contributo: 60F/D

COMPLIANCE ALLO SCREENING HIV E PREVALENZA HIV NEI TOSSICODIPENDENTI IN TRATTAMENTO

B. Suligoi* (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*); L. Camoni (*) ; G. Nicoletti** (*Ministero della Salute, Roma*); G. Ditta (**); P. Canuzzi (**); N. Magliocchetti (**); S. Belsanti (*Sert, Viterbo*); M. Franco (*Sert, Roma*)

Background: La popolazione di tossicodipendenti per via endovenosa continua ad essere un grosso serbatoio per la trasmissione dell'infezione da HIV ai non tossicodipendenti. La proporzione dei casi di AIDS che ha contratto l'infezione attraverso rapporti sessuali con tossicodipendenti è stabile nel tempo ed è circa del 3,3%. Dal rapporto annuale del Ministero della Salute sull'attività dei SERT, si evidenzia che nel 2003 la proporzione dei sieropositivi tra i tossicodipendenti testati è del 15,0%, con un andamento sostanzialmente stabile negli ultimi anni. L'informazione sul sierostato HIV, tuttavia, è disponibile solo per una parte dei soggetti che si presentano ai SERT. I singoli SERT, peraltro, inviano al ministero dati aggregati rendendo impossibile correlare i dati sierologici per HIV con altre informazioni socio-demografiche o con variabili legate alla pratica di abuso. Questo studio si propone di valutare la prevalenza dell'infezione da HIV tra tossicodipendenti in trattamento presso i SERT; di correlare dati individuali di frequenza di utilizzo e di anni di tossicodipendenza con l'attitudine ad eseguire un test e il sierostato HIV. Attraverso l'utilizzo del test per sifilide sarà possibile, inoltre, valutare il rischio di acquisire HIV attraverso il comportamento sessuale.

Metodi: Lo studio prevede la selezione di 50 SERT tra tutti i 555 SERT presenti nel territorio italiano stratificati in base alla numerosità degli utenti in modo da ottenere un campione rappresentativo della realtà italiana. Ogni SERT selezionerà, in modo casuale, 30 utenti ai quali somministrare il questionario oggetto dello studio. Il campione sarà perciò costituito da 1500 persone. In questa fase dello studio è stato definito il questionario ed è stato effettuato uno studio pilota. Il questionario comprende informazioni sociodemografiche, sull'uso di sostanze e sui test anti HIV, HAV, HBV, HCV e per sul test per sifilide.

Risultati: Allo studio pilota hanno partecipato un Sert romano ad alta utenza ed un SERT viterbese a bassa utenza. I dati dello studio pilota sono relativi a 25 pazienti, l'84% sono maschi e con un'età media di 35 anni. Il 64% dei soggetti inclusi faceva uso di eroina per via endovenosa. Attualmente l'88,0% fa trattamento farmacologico (metadone) e il 12% associa a tale trattamento anche un trattamento non farmacologico. Tra i soggetti che usano eroina per via endovena, solo il 31,5% ha eseguito un test anti HIV (l'80% con esito positivo) nonostante il 41,6% dei tossicodipendenti sia in carico presso il Sert da più di 10 anni. Se interrogati sul motivo della non effettuazione del test la maggior parte delle persone risponde di aver rifiutato il test e di non ritenerlo essenziale per la salute. Per quanto riguarda le altre patologie il 56% dei pazienti inclusi risulta positivo al test per epatite C e il 36% al test per epatite B. L'84% dei soggetti non ha mai effettuato un test per sifilide, il restante 16% ha effettuato il test ricevendo risultato negativo.

Conclusioni: I dati dello studio pilota confermano la necessità di proseguire a studiare la prevalenza dell'infezione da HIV tra i tossicodipendenti in trattamento presso i Sert e individuare i fattori che riducono l'effettuazione del test per definire strategie di intervento e campagne informative mirate.

Contributo: 60F/E

FAMIGLIA ED HIV: L'IMPATTO PSICOLOGICO DELLA COMUNICAZIONE DI SIEROPOSITIVITÀ SUL SISTEMA FAMILIARE

Alberto Vito* (*Azienda Ospedaliera "D. Cotugno", Napoli*); Loredana Cafaro (*); Giuseppe Nardini (*); Giuseppe Viparelli (*)

Background: La famiglia va considerata tra le risorse fondamentali nella presa in carico del paziente con infezione da HIV. Il paziente sostenuto da una rete familiare attiva esprime, infatti, una maggiore soddisfazione per la qualità della propria vita, presenta un minor numero di disturbi psicologici ed una migliore aderenza ai trattamenti farmacologici complessi. Tali considerazioni come pure la necessità di acquisire conoscenze più dettagliate circa le dinamiche familiari correlate all'HIV, hanno suggerito, quale obiettivo primario, l'indagine sulle reazioni che si attivano a seguito della comunicazione della diagnosi al paziente e l'individuazione dei fattori, agenti come risorse o come ostacoli, presenti all'interno della famiglia. Obiettivo più generale del progetto è la costruzione e divulgazione di modelli di intervento per il sostegno psicologico alla persona sieropositiva ed ai suoi familiari.

Metodi: Per la ricerca è stato adottato l'approccio teorico sistemico-relazionale secondo cui l'individuo deve essere osservato in relazione al contesto familiare, rilevando il suo modo di porsi in continuità o in contrasto rispetto alla sua storia passata. La ricerca, di tipo multicentrico, con svolgimento polifasico, prevede l'arruolamento di 90 soggetti sieropositivi per HIV. Criterio di inclusione: intervallo di tempo trascorso dalla comunicazione di sieropositività (0 – 6 mesi). Unico criterio di esclusione: presenza di condizioni psicopatologiche gravi secondo i criteri del DSM-IV. Il reclutamento verrà effettuato presso Strutture nazionali cui afferiscono persone HIV+. Gli strumenti prescelti saranno somministrati sia ai soggetti suddetti che ad un familiare che il paziente stesso individuerà come principale care-giver. La ricerca è di tipo qualitativo. Strumenti:

1. Scheda per la rilevazione di dati storico anagrafici
2. Intervista clinica semistrutturata, ad indirizzo teorico sistemico-relazionale. Il contenuto è stato articolato e sarà analizzato attraverso apposite griglie; la raccolta, la sistematizzazione e l'analisi del contenuto del materiale prodotto consentirà di isolare dimensioni e processi critici che caratterizzano gli aspetti relazionali della famiglia in cui uno dei membri sia sieropositivo.
3. Family Life Space, strumento grafico-simbolico, di tipo proiettivo, per indagare le relazioni familiari.

Risultati: Nel corso della prima fase (durata tre mesi) è curata la redazione degli strumenti atti alla raccolta delle informazioni rilevanti. In particolare:

1. È stato costruito lo strumento di rilevazione dei dati storico-anagrafici; nella redazione dello strumento una specifica sezione è deputata alla raccolta di informazioni specifiche: - numero di familiari che il paziente ha informato del proprio stato di salute; - tempi di comunicazione. In particolare saranno registrati l'ordine nel quale i familiari stessi sono stati informati, il tempo trascorso tra la conoscenza della propria sieropositività da parte del paziente ed il momento in cui ne ha dato comunicazione a ciascun familiare.
2. È stata impostata l'intervista clinica, semistrutturata;
3. È stata costruita la griglia di valutazione.

Conclusioni: I risultati emersi consentiranno di individuare modalità di intervento psicologico più efficaci sia nella fase relativa alla comunicazione della diagnosi, sia nelle fasi successive per facilitare la costruzione di una relazione terapeutica efficace ed aumentare la *compliance* alla cura. Obiettivo ulteriore è quello di aumentare la consapevolezza dell'importanza delle variabili familiari tra gli operatori sanitari e nell'utenza.

Contributo: 60F.20

INDICE DEGLI AUTORI

- Abbate, I.; 54; 193
Abbruzzese, L.; 234
Abideddaim, A.; 146
Accapezzato, D.; 39
Accardi, L.; 217
Accolla, R.; 29
Acinapura, R.; 163; 164
Adamo, R.; 214
Adorni, F.; 9
Affabris, E.; 30
Affronti, M.; 316
Agostini, C.; 114
Agrati, C.; 102; 146
Aiuti, F.; 31; 90; 129; 239; 256
Albano, F.; 307
Alberti, C.; 82
Albini, A.; 32; 52
Alcaro, M.C.; 43
Aldovrandi, G.; 247
Alessandri, G.; 277
Alfano, M.; 33; 50; 103; 126; 284
Aloisi, M.S.; 306
Altavilla, G.; 55
Alvisi, G.; 219
Amadori, A.; 34; 125; 264
Amati, M.; 227
Amendola, A.; 99; 146; 164
Amente, S.; 81
Amici, C.; 111
Amici, R.; 154; 174
Amicosante, M.; 5; 63
Ammassari, A.; 3; 131; 205
Andreoni, C.; 168
Andreoni, M.; 16; 63; 130; 188
Andreotti, M.; 150; 158; 168; 174
Angarano, G.; 35
Angeletti,; 188
Angeletti, C.; 18; 130; 188
Angeloni, A.; 211
Angiolella, L.; 194
Annunziato, F.; 109; 270
Antinori, A.; 3; 98; 99; 131; 132; 139; 148;
149; 163; 164; 172; 184; 186; 281
Antona, C.; 79
Antonelli, G.; 108; 133; 148
Antonimi, M.G.; 228
Antonsson, L.; 113
Antonucci, G.; 193; 218
Aquaro, S.; 36; 51; 214
Arancia, G.; 194
Arancia, S.; 204
Arancio, A.; 70; 254; 256; 259; 294
Arbustini, E.; 18
Arcieri, R.; 174
Artico, M.; 150
Ascione, A.; 140
Ascione, B.; 166
Astone, V.; 68
Atragene, D.; 144
Atzori, C.; 197
Ausiello, C.M.; 37
Avellis, L.; 17; 311
Avitabile, A.; 292
Avolio, M.; 57
Ayella, E.O.; 8
Azzetti, M.; 255; 292
Babudieri, S.; 301
Baccarini, S.; 91; 277
Bacigalupo, I.; 120; 208; 209; 244; 277; 280
Baesso, I.; 114
Bagetta, G.; 152
Bagnarelli, P.; 169
Baldanti, F.; 76; 117
Baldini, F.; 163
Balestra, E.; 51
Balestra, P.; 163; 186; 250
Balestrieri, E.; 167
Ballestri, M.; 293
Balotta, C.; 94; 147; 148; 172
Balzano, R.; 306
Balzarini, J.; 172
Bani, R.; 17
Barassi, C.; 82
Barbierato, M.; 201
Barca, S.; 140
Barchiesi, F.; 231
Bari, M.; 152
Barillari, G.; 38; 95; 120; 208; 257; 277
Barnaba, V.; 39
Barnett, S.; 258
Baroncelli, S.; 240; 255; 269; 292
Baroni, M.; 115
Bartolini, S.; 198
Basavecchia, V.; 179; 251

Basho, M.; 17
 Bassetti, D.; 134
 Bassetti, M.; 134
 Battaglia, P.A.; 40
 Battistini, A.; 41
 Baur, A.; 122
 Baxter, J.; 149
 Bearz, A.; 232
 Bedini, A.; 173
 Bei, R.; 211
 Belardelli, F.; 33; 42; 77; 135; 265
 Belardo, G.; 111
 Bellagamba, R.; 146; 164; 186; 250; 281
 Bellanova, D.; 65; 252
 Bellelli, S.; 18
 Bellenchi, G.C.; 106
 Belli, R.; 240; 255; 269; 292
 Bellino, S.; 209
 Bellocchi, M.C.; 249
 Bellocchi, M.C.; 36; 51; 98
 Bellomi, F.; 108; 133
 Belsanti, S.; 317
 Beltrami, S.; 123
 Bendinelli, M.; 43; 282
 Benelli, R.; 32
 Bensaude, O.; 81
 Bensi, T.; 67
 Beretta, A.; 136
 Beretta, R.; 316
 Bernardi, M.L.; 239
 Bernardi, P.; 60
 Bernardi, S.; 180
 Bernasconi, D.; 4; 242; 285
 Bernini, F.; 25
 Berra, E.; 74
 Berretta, M.; 232
 Bertazzoni, U.; 44; 58; 297
 Bertelli, D.; 202
 Berto, E.; 273
 Bertoli, A.; 98; 172; 249
 Bertolotto, G.; 185
 Bestetti, A.; 141; 202
 Bevacqua, G.; 268
 Biancone, L.; 52
 Biancotto, A.; 221
 Biasin, M.; 62; 79
 Biassoni, R.; 278
 Bini, T.; 147; 203
 Bino, S.; 6; 17
 Biolchini, A.; 68
 Bisacchi, D.; 32
 Bistoni, F.; 235
 Biswas, P.; 136
 Boeri, E.; 61; 142
 Bona, R.; 56; 244; 280
 Bonanni, D.; 215
 Bonci, F.; 282
 Bonecchi, R.; 88
 Bonfanti, P.; 178
 Bongiovanni, M.; 3; 203
 Bonito, M.A.; 194
 Bonmassar, E.; 214
 Bonora, S.; 131
 Bonora, S.; 131; 147
 Bordignon, V.; 95; 248
 Borghi, M.; 244; 280
 Borghi, V.; 64; 173
 Boros, S.; 5; 6
 Borsetti, A.; 41; 45; 95; 241; 258
 Bortolin, M.T.; 206
 Boschini, A.; 202
 Bosisio, E.; 199
 Bossi, V.; 20; 21
 Bossolasco, S.; 3; 202
 Bottazzi, B.; 88
 Bottelli, A.; 144
 Bottone, L.; 87; 272
 Bovolenta, C.; 46; 103
 Bozac, A.; 273
 Bozzoni, I.; 137
 Breda, D.; 48
 Brindicci, G.; 171
 Brocca Cofano, E.; 55; 243; 262
 Brunetti, B.; 301
 Bruzzese, E.; 307
 Bucci, M.; 108
 Bucciardini, R.; 153; 174
 Buffà, V.; 244; 280
 Bugarini, R.; 64; 173; 208
 Bugatti, A.; 110
 Bulgheroni, E.; 181
 Bumbaca, C.; 17; 311
 Buniotto, F.; 66
 Buonaguro, F.M.; 47
 Buonaguro, L.; 47
 Burastero, S.; 48; 82; 221; 266
 Buratti, E.; 83
 Burighel, N.; 65; 252
 Burioni, R.; 49; 61; 142
 Burra, P.; 18
 Busnack, G.; 18
 Bussolino, F.; 50; 195

Butini, L.; 50; 92
 Buttò, S.; 4; 70; 241; 242; 285
 Caballero, P.; 25
 Cabrelle, A.; 114
 Cafaro, A.; 72; 95; 255; 257; 258; 262; 269;
 278; 279; 292
 Cafaro, L.; 289; 306; 314; 318
 Caffau, C.; 206
 Calabrò, M.L.; 201
 Calcaterra, S.; 54
 Calì, R.; 36; 51
 Calistri, A.; 96; 175
 Calori, G.; 202
 Cammisa, A.; 112
 Camoni, L.; 304; 306; 316; 317
 Campagna, M.; 116; 288
 Campanale, F.; 14
 Campanini, G.; 76
 Camussi, G.; 52; 144
 Cancio, R.; 85; 117
 Cancrini, C.; 180
 Canducci, F.; 49; 61; 142
 Canini, I.; 42
 Cantaluppi, V.; 52
 Cantoni, C.; 278
 Canuzzi, P.; 317
 Capello, D.; 74
 Capitani, S.; 53
 Capobianchi, M.R.; 11; 54; 102; 146; 193
 Capone, I.; 135
 Capone, M.; 112
 Cappellacci, L.; 161
 Cappelli, G.; 63
 Capuano, A.; 185
 Caputo, A.; 55; 95; 175; 243; 258; 262
 Caputo, E.; 66
 Cara, A.; 56; 240; 244; 269; 280
 Carbonara, S.; 218; 301
 Carbonari, M.; 116
 Carbone, A.; 74; 91; 196
 Carbonella, D.; 271
 Carboni, L.; 68
 Carello, R.; 31; 239
 Cargnel, A.; 138; 197; 229; 316
 Cariani, E.; 213
 Caridi, F.D.; 112
 Carini, C.; 53
 Carlei, D.; 91; 208; 244
 Carletti, F.; 193
 Carletti, S.; 49
 Carnevalini, M.; 168
 Carosi, G.; 184; 236
 Carrieri, M.P.; 18
 Carrillo, D.; 316
 Carulli, B.; 13
 Caruso, A.; 57; 245
 Casabona, J.; 21
 Casari, S.; 228
 Casartelli, N.; 69
 Cascioferro, A.; 222
 Cascone, I.; 195
 Caselli, E.; 207
 Casetti, R.; 283
 Casoli, C.; 29; 44; 58; 226
 Cassai, E.; 207
 Cassarà, G.; 316
 Cassone, A.; 194; 198; 199; 204; 226
 Castagna, A.; 139; 169
 Castaldello, A.; 55; 243
 Castelli Gattinara, G.; 5; 134; 180
 Castelli, G.; 63
 Castillette, C.; 102
 Castrucci, M.R.; 246
 Catone, S.; 45; 269; 291; 292
 Cattaneo, E.; 295
 Cauda, R.; 105; 166; 199; 200; 204; 205; 302
 Cavallari, I.; 60
 Cavarelli, M.; 113; 287
 Cazzaniga, E.; 303
 Ceccarelli, G.; 168
 Ceccherini Silberstein, F.; 6; 98; 172; 249
 Ceccotti, P.; 24
 Cellini, S.; 262; 296
 Cerboni, C.; 69
 Cereseto, A.; 59; 120
 Cernuschi, M.; 136
 Cerri, M.; 74
 Cervasi, B.; 165
 Cesana, E.; 123
 Cesari, M.; 160
 Cesaris, L.; 138
 Chenal, H.; 63
 Cherchi, S.; 227
 Chiantore, V.; 73
 Chiappi, M.; 4; 242
 Chieco Bianchi, L.; 60; 201
 Chiesa, E.; 147
 Chiesi, A.; 130; 188
 Chiocchetti, A.; 67
 Chiodi, M.; 255; 292
 Ciabattini, A.; 275
 Ciafrè, S.; 111

Cianfriglia, M.; 140; 194
 Cianfrocca, R.; 100
 Cicconi, P.; 203
 Ciccuzzi, M.; 5; 6; 172
 Ciminale, V.; 60
 Cingolani, A.; 3; 149; 200; 205
 Cinque, P.; 3; 141
 Cirilli, A.; 217
 Citterio, F.; 18
 Clementi, M.; 61; 139; 142; 169
 Clerici, M.; 62; 79; 136; 143; 147; 160; 247
 Clevenbergh, P.; 149
 Clivio, A.; 123
 Coccia, E.; 224
 Codini, G.; 9
 Colizzi, V.; 63
 Collacchi; 294
 Collacchi, B.; 70; 256; 259; 288
 Cologni, G.; 184
 Colombo, E.; 212
 Colone, M.; 194
 Colucci, A.; 304; 306; 308; 316
 Colzani, E.; 312
 Compagnoni, D.; 91; 208
 Conaldi, P.G.; 144
 Conti, L.; 77
 Conti, S.; 226
 Continenza, F.; 164; 249
 Contini, C.; 53
 Contini, P.; 126
 Coradin, T.; 122; 189
 Corallini, A.; 22
 Corallini, F.; 53
 Corasaniti, M.T.; 152
 Corbellino, M.; 97
 Cordiali Fei, P.; 248
 Cordier, L.; 316
 Corpolongo, A.; 54; 146; 186; 250
 Correa Leite, M.L.; 13
 Corti, D.; 122
 Cosmaro, M.L.; 310
 Cosmi, L.; 109
 Cossarizza, A.; 64; 90; 145; 147; 155; 223
 Costa, C.; 225; 275
 Costa, F.; 11
 Costa, P.; 93; 278
 Costantini, A.; 92
 Costantino, L.; 229
 Costanzo, A.; 111
 Costanzo, C.; 206
 Costi, R.; 150
 Cozzi Lepri, A.; 131; 148; 155
 Crateri, P.; 194
 Crespan, E.; 117
 Crisanti, A.; 199
 Crivelli, M.; 303
 Croce, F.; 260
 Crostarosa, F.; 119; 291
 Crotti, A.; 103; 122
 Cuppone, A.; 275
 Cusini, M.; 284
 D'Agostini, A.; 304; 308
 D'Agostino, C.; 190
 D'Agostino, D.M.; 60
 D'Agosto, G.; 248
 D'Aloja, P.; 151
 D'Andrea, M.; 206
 D'Arminio Monforte, A.; 3; 98; 131; 139; 147;
 148; 155; 172; 193; 203
 D'Arrigo, R.; 5; 6; 63; 98; 132; 164; 172; 249;
 281
 D'Elia, R.; 10; 156; 157
 D'Ettore, G.; 167; 168
 D'Offizi, G.; 54; 102; 129; 146; 250; 274
 Dal Conte, L.; 316
 Dal Maso, L.; 7; 18
 Dal Monte, P.; 219
 De Berardinis, P.; 80
 De Bernardis, F.; 194; 198; 204
 De Carli, G.; 12
 De Filippis, L.; 221
 De Giuli Morghen, C.; 179; 251
 De Lerma Barbaro, A.; 29
 De Longis, P.; 131; 281
 De Luca, A.; 148; 149; 187; 200; 205
 De Maddalena, C.; 25
 De Marco, G.; 307
 De Marco, L.; 234
 De Maria, A.; 93; 278
 De Martino, M.; 23
 De Mei, B.; 268
 De Oliveira, T.; 241
 De Palma, R.; 87
 De Paoli, P.; 206
 De Pascale, M.; 112
 De Rossi, A.; 10; 65; 66; 156; 157; 252
 De Santis, W.; 31; 239
 De Simone, R.; 106
 Deambroggi, C.; 74
 Deambrosio, L.; 52
 Declich, S.; 8
 Del Borgo, C.; 193

Del Cornò, M.; 77
 Del Duca, C.; 152
 Del Giacco, G.S.; 253
 Del Mistro, A.; 10
 Del Pozzo, G.; 80
 Del Vecchio, C.; 175
 Delbue, S.; 212
 Dell'Agli, M.; 199
 Della Bella, S.; 123
 Delmonte, O.; 185
 Delogu, G.; 68; 210; 222
 Denti, M.; 137
 Dentone, C.; 134
 Deregibus, M.C.; 52
 Dervishi, M.; 6; 17
 Dettin, M.; 66
 Di Bello, C.; 66
 Di Biagio, A.; 134
 Di Bonito, P.; 217
 Di Campli, F.; 190
 Di Carlo, A.; 254; 256; 294
 Di Cesare, S.; 180
 Di Gangi, I.M.; 201
 Di Gennaro, G.; 233; 234
 Di Giambenedetto, S.; 149; 200; 205
 Di Luca, D.; 207
 Di Marco, P.; 133
 Di Perri, G.; 131
 Di Salle, E.; 286
 Di Santo, F.; 36
 Di Santo, R.; 150
 Dianzani, F.; 108
 Dianzani, U.; 67
 Ditta, G.; 317
 Doglioni, C.; 71
 Dolei, A.; 68
 Dominici, S.; 271
 Donà, M.G.; 217
 Donati, S.; 42; 135; 265
 Doria, M.; 69
 Dorrucchi, M.; 16
 Dottorini, T.; 199
 Dragoti, E.; 311
 Dupuis, M.L.; 140
 Ebranati, E.; 25
 El Hamad, I.; 308
 Elli, V.; 251
 Elviri, L.; 58
 Ensoli, B.; 4; 38; 41; 45; 56; 70; 72; 91; 95;
 116; 120; 209; 214; 240; 241; 242; 243;
 244; 255; 256; 257; 258; 259; 262; 269;
 271; 273; 276; 277; 278; 279; 280; 288;
 292; 294
 Ensoli, F.; 70; 239; 248; 254; 256; 259; 276;
 288; 294
 Esposito, A.; 31
 Esposito, R.; 64; 173
 Fabiani, M.; 8
 Facchetti, F.; 71
 Facco, M.; 114
 Fadda, G.; 205; 210; 230
 Faggioni, A.; 211
 Falchi, M.; 91; 120; 208
 Falcone, C.; 286
 Fanales Belasio, E.; 37; 38; 72; 257; 279
 Fanti, M.; 312
 Farcomeni, S.; 119; 255; 291; 292
Farina, A.; 211
 Fattorini, L.; 225
 Fausto, A.; 203
 Fazio, A.; 70; 256; 259
 Fazio, A.L.; 294
 Fedele, G.; 37
 Fedeli, P.; 9; 260
 Federico, M.; 30; 46; 68; 73; 144; 151
 Fenyó, E.M.; 113; 287
 Ferioli, E.; 144
 Ferrante, P.; 79; 212
 Ferrantelli, F.; 258
 Ferrari, C.; 213
 Ferrari, D.; 220
 Ferrario, G.; 79
 Ferrazin, A.; 134
 Ferrazzi, E.; 147; 303
 Figliomeni, M.; 311
 Fimiani, C.; 31; 276
 Finazzi Agrò, A.; 152
 Finazzi, M.G.; 3
 Fiore, J.; 316
 Fiore, J.R.; 14
 Fiore, S.; 147
 Fiorelli, V.; 70; 95; 256; 259; 271; 276; 288;
 294
 Fiorentini, S.; 57; 125; 245
 Fiorucci, G.; 30; 73
 Fittipaldi, A.; 59; 78
 Fiume, G.; 104
 Flego, M.; 140
 Florida, M.; 153; 154
 Fogli, M.; 93; 278
 Foglieni, C.; 221
 Forbici, F.; 132; 249

Forte, G.; 108
 Forte, M.; 150
 Fortini, C.; 216; 262; 296
 Fortis, C.; 176
 Fournié, J.J.; 283
 Fragola, V.; 153; 174
 Francavilla, V.; 39; 70; 256; 259; 294
 Franceschi, S.; 7
 Franchetti, P.; 161
 Franco, M.; 317
 Franconi, R.; 217
 Franzese, O.; 214
 Franzetti, F.; 160
 Frasca, L.; 37
 Frascaroli, G.; 219
 Fraternali, A.; 165
 Fratino, L.; 163
 Freer, G.; 282
 Fregonese, F.; 156; 157
 Frugis, D.; 169
 Fuda, F.; 311
 Fulgenzi, D.; 45; 241
 Furci, L.; 266
 Fusetti, G.; 139
 Gabiano, C.; 23; 307
 Gafa, V.; 224
 Gagliardi, C.; 224
 Gagliardoni, F.; 262
 Gago, F.; 98; 172
 Gaidano, G.; 74
 Galati, V.; 102
 Galgani, S.; 186
 Gallerani, E.; 262
 Galli, G.; 199
 Galli, L.; 23; 141
 Galli, M.; 9; 25; 75; 155; 160; 181; 260
 Gallo, P.; 261; 304; 308
 Galluzzi, L.; 145
 Galluzzo, C.M.; 154; 174
 Galluzzo, M.C.; 150
 Galvan, M.; 207
 Gandini, L.; 118
 Garulli, B.; 246
 Garzelli, C.; 215
 Gasperini, P.; 201
 Gattei, V.; 234
 Gavioli, R.; 216; 243; 258; 262; 296
 Gennero, L.; 50
 Gentili, F.; 71
 Geraci, A.; 130; 188
 Gerevini, S.; 202
 Germinario, E.A.P.; 153; 154; 159; 174
 Gerna, G.; 76; 117
 Gessani, S.; 77
 Ghezzi, S.; 103; 176; 189; 284
 Ghiringhelli, B.; 305
 Giacca, M.; 50; 59; 95; 263
 Giacomet, V.; 307
 Giacomini, E.; 224
 Giancola, L.; 163
 Giancola, M.L.; 3
 Gianelli, E.; 260
 Giannecchini, S.; 43
 Giannella, S.; 98
 Giannetto, C.; 70; 256; 259; 294
 Gianotti, N.; 136; 187
 Giaquinto, C.; 10; 65; 134; 156; 157; 252; 305;
 307
 Giardino Torchia, M.L.; 105
 Gibellini, D.; 107
 Gigliani, F.; 40
 Gillim, L.; 56
 Gioia, C.; 102; 146
 Giordani, L.; 124
 Giorgi, C.; 217
 Giovenzana, C.; 145
 Girardi, E.; 11; 24; 129; 218; 306
 Girolamo, A.; 204
 Giuliani, M.; 254; 294; 302
 Giuliano, M.; 158; 159; 174
 Giuliodoro, S.; 92
 Gloghini, A.; 74; 91; 196
 Goletti, D.; 283
 Gomez Morales, M.A.; 227
 Gonnella, R.; 211
 Gori, A.; 79; 143; 160
 Gori, C.; 6; 98; 132; 172; 249
 Gougeon, M.L.; 102
 Gramiccioni, C.; 31; 90; 239
 Granato, M.; 211
 Granato, T.; 51
 Grant, S.; 198
 Grassi, M.; 63
 Grasso, F.; 217
 Greco, F.; 92
 Gregis, G.; 182
 Grelli, S.; 167
 Grifantini, M.; 161
 Grisetti, S.; 3; 306
 Grivel, J.C.; 103
 Grosso, M.G.; 209
 Guaraldi, G.; 145; 173

Guarino, A.; 307
 Guerini, F.; 212
 Guidi, M.; 153
 Guidotti, G.; 158
 Gutierrez, M.I.; 59; 78
 Harxhi, A.; 6; 17
 Hasson, H.; 136
 Heltai, S.; 122
 Hinkula, J.; 47
 Holton, J.; 198
 Horejsh, D.; 283
 Iaccino, E.; 286
 Iale, E.; 292
 Iardino, R.; 303
 Ilari, R.; 41
 Illiano, E.; 217
 Impara, G.; 254
 Incitti, F.; 255; 292
 Indraccolo, S.; 34; 125; 264; 280
 Ingrassia, F.; 14
 Innocenti, F.; 153
 Ippolito, G.; 11; 12; 186; 218; 306
 Isgrò, A.; 90; 239
 Isola, P.; 43
 Itro, I.; 17; 311
 Ivaldi, F.; 87; 272
 Kakarriqi, E.; 17
 Kankasa, C.; 247
 Karlsson, I.; 113; 287
 Khoeler, B.; 218
 Klotman, M.; 56
 Kodra, Y.; 17; 311
 Koopman, G.; 278
 Kotenko, S.; 68
 Kroemer, G.; 99
 Kuhn, L.; 247
 Kyoto, C.; 285
 La Sorda, M.; 230
 La Valle, R.; 198
 Ladisa, N.; 131
 Lagioia, A.; 35; 171
 Laguardia, M. E.; 271
 Lajolo, C.; 302
 Lande, R.; 224
 Landini, M.P.; 219
 Lania, L.; 81
 Lanzoni, I.; 273
 Lapenta, C.; 33; 42; 135; 265
 Lari, N.; 215
 Larocca, L.M.; 99
 Larussa, D.; 3; 163
 Latini, A.; 254
 Lauria, F.; 167
 Laurino, L.; 97
 Laus, M.; 243
 Lazzarin, A.; 48; 82; 133; 136; 141; 162; 176;
 183; 202; 220; 284; 290
 Lenzi, A.; 118
 Leoncini, F.; 201
 Leone, P.; 56; 91; 209; 244; 280
 Leoni, P.; 92
 Leti, W.; 31; 90
 Levrero, M.; 111; 229
 Li Pira, G.; 87; 272
 Libi, F.; 288
 Lichtner, M.; 190
 Lillo, F.; 220
 Lim, M.G.; 263
 Liotta, F.; 270
 Liotta, G.; 158
 Lissoni, F.; 247
 Liu, H.; 198
 Liuzzi, G.; 24; 163; 164; 281
 Lo Caputo, S.; 281
 Locatelli, G.; 117
 Locati, M.; 88
 Lodini, S.; 220
 Longhi, E.; 97
 Longhi, R.; 84
 Longo, B.; 16; 18; 301
 Longo, O.; 70; 256; 259; 294
 Longordo, F.; 106
 Lopalco, L.; 48; 82; 83
 Lopes, A.R.; 214
 Loregian, A.; 96
 Lorenzini, P.; 3; 132; 139; 186
 Lovicu, G.; 9
 Luberto, L.; 104
 Lucia, B.; 166
 Ludovisi, A.; 227
 Lupo, R.; 46
 Lusic, M.; 59; 78
 Lusso, P.; 84
 Lusso, P.; 48; 121; 221; 266
 Luzi, A.M.; 267; 268; 304; 308
 Maccarrone, M.; 152
 Macchi, B.; 167
 Macchia, I.; 72; 257; 258; 269
 Madeddu, G.; 131
 Maga, G.; 76; 85; 117
 Maggi, E.; 109; 270
 Maggiolo, F.; 139; 182

Maggiorella, M.T.; 119; 241; 255; 291; 292
 Maghazachi, A.; 77
 Magliani, W.; 226
 Magliocchetti, N.; 317
 Magnani, M.; 161; 165; 271
 Magoni, M.; 184
 Magri, G.; 62
 Maier, J.; 86
 Maini, A.; 254
 Maini, M.K.; 214
 Mainiero, F.; 120
 Majello, B.; 81
 Majori, G.; 199
 Malacarne, M.; 138
 Malavasi, F.; 37
 Malavasi, L.; 91; 208
 Malkovsky, M.; 146
 Malnati, M.; 136; 221
 Malorni, W.; 166
 Mamelì, G.; 68
 Mammarella, M.; 61; 142
 Manca, F.; 87; 272
 Mancini, M.G.; 174
 Mancini, N.; 49
 Mancini, S.; 92
 Manconi, P.E.; 253
 Mancuso, R.; 212
 Mandarino, G.; 204
 Manganaro, L.; 59; 78
 Manganelli, R.; 222
 Mangino, G.; 30
 Maniero, F.; 195
 Manservigi, R.; 273
 Mantelli, B.; 136
 Mantovani, A.; 88
 Maracci, M.; 231
 Marangi, M.; 35
 Marazzi, C.; 158
 Marcello, A.; 59; 78
 Marchand, C.; 150
 Marchetti, G.; 79; 160
 Marchini, F.; 201
 Marchiò, S.; 50
 Marchioni, E.; 212
 Marconi, P.; 131; 163; 164; 273
 Marcotullio, S.; 267
 Margolis, L.; 103; 221
 Mariani, F.; 63
 Marigliano, A.; 231
 Marin, O.; 60
 Marinelli, R.; 91
 Marini, A.; 292
 Marini, E.; 57; 245
 Mariniello, A.; 315
 Mariotti, M.; 86
 Marone, G.; 89
 Marrelli, S.; 71
 Marsili, G.; 41
 Martellotta, F.; 233
 Martinelli, C.; 201
 Martini, F.; 22; 129; 146; 274
 Martino, A.; 283
 Martino, A.M.; 5
 Martrò, E.; 21
 Marus, A.; 206
 Marziali, M.; 31; 239
 Marzocchetti, A.; 205
 Masci, A.M.; 105
 Mascolo, D.; 80
 Maserati, R.; 143; 212
 Masiero, S.; 175
 Massa, S.; 217
 Massella, M.; 153
 Masserizzi, G.; 201
 Massetti, A.P.; 190
 Massetto, B.; 25; 170; 260
 Mastino, A.; 167
 Mastroianni, C.M.; 168; 190
 Matarrese, P.; 166
 Mattei, A.; 153; 154; 159
 Mattei, M.; 63
 Matteucci, C.; 167
 Matteucci, D.; 282
 Mattioli, B.; 124
 Matucci, A.; 297
 Mavilio, F.; 46
 Mazza, A.; 10
 Mazza, F.; 197
 Mazza, S.; 93
 Mazzarella, G.; 112
 Mazzetta, F.; 31; 239
 Mazzetti, P.; 282
 Mazzotta, F.; 143; 184; 281
 Mazzuccato, M.; 234
 Meacci, F.; 225
 Medaglini, D.; 275
 Meggio, F.; 60
 Mei, A.; 68
 Mei, J.; 21
 Melzi, S.; 203
 Mena, M.; 202
 Menegatti, A.; 22

Mengoni, F.; 190
 Menicagli, L.; 203
 Menzo, S.; 169
 Meola, M.; 246
 Meroni, L.; 75; 160
 Mesturini, R.; 67
 Mezzaroma, I.; 31; 90; 256; 276
 Mezzetti, M.; 11
 Micheletti, F.; 296
 Michelini, Z.; 56; 255; 258
 Michieli, M.; 234
 Miele, G.; 150
 Mikulak, J.; 121
 Milazzo, L.; 170
 Mingari, M.C.; 93
 Minghetti, L.; 106
 Minutolo, A.; 167
 Minuzzo, S.; 34; 264
 Miorin, M.; 114
 Mirra, M.; 153
 Missale, G.; 213
 Miyazawa, M.; 62
 Moi, P.; 13
 Molinari, A.; 194
 Mollace, V.; 51
 Mollicone, B.; 129
 Mologni, D.; 75
 Monarca, R.; 301
 Monari, C.; 235
 Mondello, F.; 204
 Monini, P.; 91; 95; 116; 208; 209; 216; 258;
 277
 Monno, L.; 171
 Montella, F.; 167
 Montesano, C.; 5; 63
 Montroni, M.; 92
 Monzo, F.R.; 180
 Moracci, 277
 Moracci, G.; 91; 277
 Morelli, C.; 22
 Moretta, A.; 93; 278
 Moretta, L.; 93; 278
 Moretti, F.; 3; 202
 Moretti, S.; 38; 72; 257; 279
 Moricoli, D.; 271
 Mormone, E.; 166
 Moroni, M.; 79; 94; 160; 172
 Moroni, M.E.; 309
 Morsica, G.; 284
 Moserle, L.; 34; 264
 Mothanje, B.L.; 199
 Muciaccia, B.; 118
 Muller, A.; 217
 Murdaca, G.; 93
 Murri, R.; 131
 Muscoli, C.; 51
 Musicco, M.; 9
 Mussini, C.; 64; 94; 139; 145; 173; 223
 Naim, V.; 40
 Napione, L.; 195
 Napolitano, G.; 81
 Nappi, F.; 72; 95; 120; 258
 Nappi, G.; 152
 Narciso, L.; 250
 Narciso, P.; 132; 146; 186; 281
 Nardacci, R.; 99
 Nardini, G.; 289; 314; 315; 318
 Nasi, M.; 64; 173
 Nasta, P.; 131
 Nattabi, B.; 8
 Negri, D.M.R.; 255
 Negri, D.R.M.; 240; 244; 269; 280
 Nemes, E.; 173
 Nencioni, L.; 150
 Neri, F.; 69; 122; 176
 Nicastrì, E.; 130; 188
 Nicola, S.; 123
 Nicoletti, G.; 317
 Nicolosi, A.; 13
 Nisii, C.; 102
 Nisini, R.; 224
 Noonan, D.; 32
 Nordqvist, A.; 287
 Novellino, E.; 150
 Novello, C.; 305
 Nozza, S.; 136; 162; 176
 O'Mahony, R.; 198
 Officioso, A.; 307
 Oggioni, M.R.; 225
 Ogwang, M.; 8
 Oldrini, M.; 310
 Oletto, S.; 305
 Olimpico, F.; 104
 Oliveri, A.; 310
 Olivetta, E.; 30; 73
 Orani, A.; 184
 Orefici, G.; 225
 Oreste, P.; 189
 Orlando, G.; 145
 Orrù, G.; 225
 Orsatti, R.; 41
 Orsi, C.; 223

Padula, F.; 118
 Pagani, L.; 225
 Pagani, M.; 138
 Paganini, M.; 179; 251
 Pagnotti, P.; 133
 Paiardini, M.; 165
 Palamara,; 254
 Palamara, A.; 150
 Palamara, A.T.; 194
 Palamara, G.; 256
 Palazzo, R.; 37
 Paleari, L.; 32
 Palladino, C.; 38; 208; 277
 Palma, P.; 180
 Palmieri, C.; 104; 286
 Palmieri, G.; 63
 Palmieri, S.; 141
 Palmisano, L.; 130; 150; 174; 188
 Palombi, L.; 158
 Palù, G.; 96; 175
 Palumbo, E.; 177
 Pan, A.; 15
 Pancino, G.; 121
 Paniccia, G.; 70; 256; 259; 294
 Paoloni, M.L.; 153
 Paolucci, C.; 48; 221
 Paolucci, S.; 76; 117
 Papini, A.M.; 43
 Pardini, M.; 225
 Parisi, S.; 133
 Parlato, S.; 42
 Parolin, C.; 96; 175
 Parravicini, C.; 97
 Pasqualini, C.; 20
 Pasqualini, M.; 161
 Pasquarella, C.; 312
 Pasquato, A.; 66
 Pastore, A.; 287
 Pastore, G.; 14; 316
 Pastori, C.; 82; 83
 Pavone Cossut, M.R.; 72; 255; 257; 279
 Pavone, V.; 84
 Pedale, R.; 141
 Penazzato, M.; 156; 157
 Pensieroso, S.; 180
 Percario, Z.A.; 30
 Peretti, S.; 151
 Perfettini, J.L.; 99
 Pericolini, E.; 235
 Perno, C.F.; 5; 6; 24; 36; 51; 63; 98; 132; 139;
 148; 149; 164; 172; 214; 226; 249; 281
 Perotti, M.; 49
 Perrotti, E.; 41
 Petrosillo, N.; 15; 236
 Pezzotta, P.; 310
 Pezzotti, P.; 139; 306
 Pfeffer, U.; 32
 Piacentini, L.; 62
 Piacentini, M.; 99
 Piccinini, M.; 185
 Picciotto, A.; 93
 Piccirilli, S.; 152
 Piccolella, E.; 100
 Piedimonte, G.; 101
 Pierangeli, A.; 133
 Pignatelli, S.; 219
 Pilli, M.; 213
 Pilotti, E.; 29; 44; 58; 226
 Pinna, D.; 189
 Pinna, L.; 60
 Pinter, E.; 276
 Pinti, M.; 64; 90; 145; 155; 173; 223
 Piovan, E.; 34; 125
 Pirillo, M.F.; 153; 154; 158; 159; 174
 Pisani, G.; 24
 Piselli, P.; 18; 186
 Pistello, M.; 43; 282
 Pittaluga, A.; 106
 Pizzi, D.; 249
 Plebani, A.; 113; 287
 Poccia, F.; 102; 146; 283
 Poggi, A.; 126
 Polesel, J.; 7
 Poli, G.; 33; 58; 71; 82; 103; 176; 284
 Polizzi, C.; 153; 154
 Pollicino, T.; 229
 Pollicita, M.; 36; 51; 214
 Polonelli, L.; 226
 Pommier, Y.; 150
 Ponti, D.; 40
 Pontrelli, G.; 63
 Ponz De Leon, M.; 7
 Ponzoni, M.; 71
 Possenti, A.; 227
 Posteraro, B.; 230
 Potestà, M.; 69
 Pozio, E.; 227
 Pozzi, G.; 177; 275
 Pradier, C.; 18
 Pratesi, C.; 206
 Presta, M.; 110
 Prestileo, T.; 308

Presutti, C.; 137
 Previati, M.; 53
 Primo, L.; 50
 Prospero, M.; 149; 187
 Psaila, R.; 40
 Puca, A.; 104
 Pucillo, L.; 274
 Puddu, P.; 140
 Pugliese, K.; 151
 Punzi, G.; 35; 171
 Puoti, M.; 193; 228
 Pupino Carbonelli, P.; 255; 269; 279; 292
 Puro, V.; 12
 Pusceddu, C.; 210
 Quaranta, M.G.; 124
 Quinto, I.; 104; 286
 Quinzan, G.; 182
 Quirino, T.; 178
 Quiros Roldan, E.; 184
 Qyra, S.; 6
 Racioppi, L.; 105; 112
 Radaelli, A.; 179; 251
 Raffa, G.; 229
 Raffa, S.; 211
 Raimondi, D.; 14
 Raimondo, G.; 229
 Raiteri, M.; 106
 Rampon, O.; 10; 156; 157; 305
 Ranazzi, A.; 36; 51
 Ranghiasi, A.; 8
 Rastrelli, E.; 199
 Ravelli, C.; 110
 Re, M.C.; 107
 Regazzi Bonora, M.; 158
 Regazzi, M.; 157; 184
 Regnery, C.M.; 92
 Remoli, A.L.; 41
 Remoli, M.E.; 224
 Renda, V.; 133
 Rezza, G.; 6; 7; 16; 17; 18; 20; 21; 70; 209;
 285; 311
 Ribatti, D.; 110
 Ribechini, E.; 216
 Ricci, E.; 178
 Ricci, S.; 275
 Ricotti, E.; 185
 Ridolfi, B.; 41; 45; 241
 Ridolfo, A.; 97
 Rigotti, P.; 201
 Rinaudo, M.T.; 185
 Rindi, L.; 215
 Ripalti, A.; 219
 Ripamonti, C.; 113; 287; 297
 Ripamonti, D.; 182
 Riva, A.; 25; 75; 123; 131; 155; 170; 260
 Riva, C.; 94
 Riva, E.; 108
 Rizza, P.; 135
 Rizzardini, G.; 143
 Rizzi, C.; 33
 Roat, E.; 145
 Roitt, I.; 198
 Romagnani, S.; 109
 Romano Mascia, T.; 112
 Romano, L.; 187
 Romeo, G.; 30
 Romiti, M.L.; 180
 Ronzi, P.; 44
 Rossi, A.; 111
 Rossi, C.; 97
 Rossi, D.; 74
 Rossi, L.; 161
 Rossi, P.; 5; 63; 69; 180
 Rossi, R.; 190
 Rosso, R.; 134
 Rossolillo, P.; 297
 Roux, A.; 150
 Rovero, P.; 43
 Rovetto, C.; 4; 240
 Rozera, C.; 111
 Rozera, G.; 54
 Ruiz Alvarez, M.J.; 6; 70; 256; 259; 294
 Ruiz, L.; 149
 Rupolo, M.; 234
 Rusconi, S.; 181; 260
 Rusnati, M.; 33; 110
 Sabò, A.; 78
 Sacchi, A.; 146
 Saccomandi, P.; 51
 Saggiaro, D.; 60
 Sala, S.; 141
 Sala, Serena; 202
 Sala, Stefania; 202
 Salata, C.; 96
 Salvatori, F.; 186
 Salvi, L.; 209
 Sampaolesi, A.; 306
 Sanchez, M.; 73
 Sandini, S.; 198
 Sanguinetti, M.; 205; 230
 Sannella, A.; 199
 Sant'Agostino, E.; 122

Santagostino, E.; 284
 Santangelo, R.; 210
 Santarelli, R.; 211
 Santarasci, V.; 270
 Santini, S.M.; 33; 42; 135; 265
 Santoro, A.; 71; 304
 Santoro, F.; 49; 221; 266
 Santoro, M.; 98; 172
 Santoro, M.G.; 111
 Saraceni, S.; 53
 Saracino, A.; 35; 171
 Sarassi, A.; 225
 Sardanelli, F.; 203
 Saresella, M.; 79; 212
 Sarmati, L.; 130; 188
 Savarino, A.; 67; 199
 Savasi, V.; 303
 Scagnolari, C.; 108
 Scala, G.; 104; 112; 286
 Scalise, G.; 231
 Scaramuzzi, D.; 288
 Scarlatti, G.; 113; 115; 287; 297
 Scarponi, E.; 60
 Schenal, M.; 160
 Schiavone, M.; 286
 Schiavone, P.; 107
 Schiavoni, I.; 151
 Schinaia, N.; 6; 17; 311
 Schioppa, O.; 233
 Schioppa, T.; 88
 Schols, D.; 36
 Schroeder, U.; 47
 Sciandra, M.; 21
 Sciaranghella, G.; 91
 Scoglio, A.; 70; 256; 259; 294
 Scognamiglio, P.; 250
 Scozzafava, A.; 181
 Scudeller, L.; 236
 Semenzato, G.; 114
 Serafini, G.; 271
 Serafini, S.; 161; 165
 Sernicola, L.; 119; 241; 255; 291; 292
 Serra, C.; 68
 Serraino, D.; 16; 18; 186
 Sette, P.; 163; 175
 Setti, M.; 93
 Severa, M.; 224
 Severini, C.; 199
 Sgadari, C.; 38; 91; 120; 208; 209; 244; 277
 Sgarbanti, M.; 41
 Sica, A.; 88
 Sicard, H.; 283
 Siccardi, A.; 83
 Siccardi, A.G.; 115
 Sichi, O.; 43
 Sighinolfi, L.; 131
 Signorelli, C.; 312
 Silic Benussi, M.; 60
 Silvaggi, C.; 313
 Silvestri, G.; 92; 165
 Simonelli, C.; 206; 234; 313
 Simonetti, E.; 248
 Simpure, J.; 63
 Sing, T.; 98
 Sirabella, P.; 42
 Sirianni, M.C.; 116; 288
 Sironi, F.; 48; 84; 266
 Smith, A.; 221
 Sodano, M.; 171
 Soldani, F.; 163
 Soldini, L.; 176
 Soligo, M.; 100
 Solmone, M.C.; 11
 Soprana, E.; 83; 115
 Sotgiu, G.; 212
 Sozzani, S.; 71
 Spaccapelo, R.; 199
 Spaccasassi, S.; 293
 Spada, M.; 33; 42; 135; 265
 Spadari, S.; 85; 117
 Spagnuolo, P.; 152
 Spano, F.; 227
 Sparnacci, K.; 243
 Spensieri, F.; 37
 Spina, M.; 232; 234
 Spoladore, G.; 212
 Spreghini, E.; 231
 Squadrito, G.; 229
 Starace, F.; 289; 306; 307; 314; 315
 Starnini, G.; 301
 Stefanelli, P.; 19
 Stefanile, R.; 112
 Stefanini, M.; 118
 Stellacci, E.; 41
 Stillitano, M.G.; 246
 Stivali, F.; 70; 254; 256; 259; 294
 Stringaro, A.; 194
 Strippoli, R.; 120
 Sulaj, Z.; 311
 Suligoi, B.; 4; 19; 20; 21; 285; 304; 316; 317
 Superti, F.; 95
 Supuran, C.T.; 181

Suter, F.; 182
 Svicher, V.; 98; 172; 281
 Taccagni, G.; 220
 Tacconelli, E.; 204
 Tagliamonte, M.; 47
 Tamburrini, E.; 200
 Tambussi, G.; 162; 176; 183; 290
 Tanghetti, E.; 110
 Tasciotti, E.; 263
 Taskaris, G.; 82
 Tassan Din, C.; 183; 290
 Tateo, M.; 316
 Tateo, M.G.; 14
 Tavoche, L.; 4
 Tchangmena, O.; 285
 Tchidjou Kuekou, H.; 5; 180
 Tedeschi, R.M.; 206
 Teloni, R.; 224
 Tempestilli, M.; 146
 Terreni, M.; 59
 Testa, C.; 194
 Tinari, A.; 95; 166
 Tirelli, U.; 74; 232; 233; 234
 Titti, F.; 119; 240; 255; 258; 269; 291; 292
 Toccaceli, L.; 194
 Todhri, F.; 311
 Tognon, M.; 22
 Tolazzi, M.; 266
 Tombesi, M.; 140
 Tondelli, L.; 243; 293
 Toniolo, A.; 29
 Torelli, R.; 230
 Toriello, M.; 112
 Tornesello, M.L.; 47
 Torrisi, M.R.; 39; 211
 Torti, C.; 139; 184; 187
 Toschi, E.; 120; 208; 209; 277
 Tosello, V.; 34; 125; 264
 Tosi, G.; 29
 Tosini, F.; 227
 Tovo, P.A.; 23; 185
 Tozzi, V.; 132; 163; 164; 186; 250
 Trabattoni, D.; 62; 143; 160; 247
 Trasarti, E.; 227
 Trentin, L.; 114
 Trento, E.; 248
 Trimarchi, M.; 103
 Trimboli, F.; 104
 Tripiciano, A.; 70; 254; 256; 259; 294
 Tripodi, F.M.; 313
 Triulzi, C.; 55; 243
 Troiano, L.; 64; 145; 173
 Tronconi, E.; 197
 Trotta, M.P.; 3; 131; 132; 163
 Troupioti, P.; 225
 Tuccillo, F.M.; 286
 Tumbarello, M.; 302
 Tuosto, L.; 100
 Turano, M.; 81
 Turci, M.; 44; 297
 Turriziani, O.; 108; 133
 Tyagi, M.; 95
 Ubbiali, A.; 295
 Uberti Foppa, C.; 82; 220
 Ulivi, G.; 149
 Urbani, F.; 42
 Urbinati, C.; 110
 Vaccher, E.; 232; 233; 234
 Valensin, P.E.; 187
 Valerio, A.; 197
 Vallanti, G.; 46
 Valli, R.; 261; 304; 308
 Valvo, C.; 261
 Vanacore, P.; 11; 218
 Vanelli, P.; 79
 Varani, S.; 219
 Varano, B.; 77
 Varaschin, P.; 206
 Vardabasso, C.; 78
 Vardas, E.; 4; 242
 Vassena, L.; 84; 266
 Vasta, C.; 19
 Vecchi, A.; 88; 136
 Vecchi, M.; 169
 Vecchiarelli, A.; 235
 Veglia, F.; 176
 Vella, S.; 130; 153; 154; 158; 167; 174; 188
 Venanzi, S.; 40
 Vendrame, A.; 114
 Vento, A.; 248
 Venuti, A.; 217
 Verani, A.; 121
 Vergone, A.; 314
 Vermi, W.; 71
 Veronese, L.; 316
 Vescovi, A.; 221
 Viale, P.; 15; 236
 Vicenzi, E.; 58; 122; 176
 Vicenzi, V.; 189
 Vicini, E.; 118
 Viganò, A.; 5; 134
 Viganò, O.; 181

Vigevani, G.M.; 178
Villa, M.; 13
Villa, M.L.; 123
Viora, M.; 124
Viparelli, G.; 314; 315; 318
Visco Comandini, U.; 24; 132; 164; 193; 281
Visco, V.; 39
Visintini, R.; 295
Vitale, A.; 274
Vitiello, L.; 105
Vito, A.; 289; 315; 318
Vitone, F.; 107
Vlassi, C.; 186; 250
Volinia, S.; 296
Volpi, I.; 273
Voltan, R.; 55; 243
Vullo, V.; 167; 168; 190; 308
Walker, S.; 65
Weimer, L.; 159; 174
Zabogli, E.; 282
Zaccarelli, M.; 132; 163; 164
Zaffiri, L.; 168
Zamarchi, R.; 34; 125; 264
Zambelli, A.; 138
Zambello, R.; 114
Zamboni, S.; 140
Zanchetta, M.; 65; 66; 156; 157; 252
Zanetti, S.; 210
Zanini, B.; 228
Zanotto, C.; 179; 251
Zanussi, S.; 206
Zara, F.; 225
Zazzi, M.; 94; 187
Zehender, G.; 25
Zerbi, P.; 97
Zerbini, A.; 213
Zipeto, D.; 44; 297
Zocchi, M.R.; 126
Zoncato, S.; 222

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@jss.it.*

*Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, marzo 2005 (n. 1) 1° Suppl.