

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



Scuola di dottorato in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali

XXV Ciclo Dottorato Di Ricerca

"MALATTIE INFETTIVE"

**Studio della traslocazione di Macromolecole Microbiche e dei
Reservoir Virali come Possibili Meccanismi Patogenetici di Mancato
Recupero di CD4 in soggetti HIV-positivi**

Tutor: Dr.ssa Giulia Carla MARCHETTI

Coordinatore: Prof.ssa Antonella D'ARMINIO MONFORTE

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Antonella Monforte', written over the printed name of the coordinator.

Tesi di Dottorato di Ricerca di

MERLINI ESTHER

Matr. R08532

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

A mia mamma

Indice

<u>INTRODUZIONE</u>	6
• I. Ruolo dell'attivazione immune nella patogenesi dell'infezione da HIV	7
○ 1. Conseguenze dell'infezione da HIV sul sistema immunitario innato	7
○ 2. Elevato turnover T linfocitario e marker di immunoattivazione	9
• II. Traslocazione microbica in corso di infezione da HIV	14
○ 1. TLR: alterazioni in pazienti HIV+ e HIV-	14
○ 2. Traslocazione microbica in corso di infezione da HIV e nell'immunoricostruzione in corso di HAART	18
• III. Reservoir virali in corso di infezione da HIV	21
○ 1. Come si instaura e mantiene la latenza	21
○ 2. Strategie terapeutiche per l'eradicazione dei reservoir virali	23
• IV. Ruolo della HAART nell'infezione da HIV	26
○ 1. Immunoricostruzione in corso di HAART	26
○ 2. Risposte discordanti alla HAART	27
 SCOPO DELLO STUDIO	 29
 PARTE I. Studio della composizione della flora traslocante	 34
• <i>Materiali e Metodi</i>	35
○ Reclutamento pazienti	35
○ Misurazione livelli plasmatici di LPS e sCD14	35
○ PCR 16S panbatterica	35
○ Clonaggio e sequenziamento	36
○ Analisi statistiche	36
• <i>Risultati</i>	37
○ Caratteristiche dei pazienti in studio	37
○ I pazienti HIV-infetti che iniziano la HAART con una grave linfopenia mostrano livelli di traslocazione microbica persistentemente elevati	37
○ I pazienti <i>Immunological Non Responders</i> mostrano una maggiore presenza in circolo di frammenti genomici di origine batterica	38
○ I pazienti HIV-infetti che iniziano la HAART con una grave linfopenia si caratterizzano per una composizione polimicrobica della flora circolante	38
• <i>Discussione</i>	40
 PARTE II. Studio della stimolazione dei Toll-like Receptors (TLR)	 41
• <i>Materiali e Metodi</i>	42
○ Reclutamento pazienti	42
○ Isolamento e coltura di monociti primari	42
○ Stimolazione di PBMC e MDM	43
○ Citofluorimetria	43
○ Saggio ELISA per la rilevazione dell'antigene p24 di HIV	44
○ Misurazione dei livelli di LPS e sCD14	44
○ Analisi statistiche	44

• <i>Risultati</i>	45
○ Caratteristiche dei pazienti in studio.....	45
○ Nei soggetti naive alla terapia antiretrovirale la stimolazione dei TLR si traduce in un debole effetto sull'attivazione e sulla produzione virale.....	45
○ La stimolazione dei TLR determina una diversa attivazione T-cellulare in accordo al grado di immuno-ricostituzione in corso di HAART	47
○ La stimolazione virale, ma non quella batterica, determina una maggiore attivazione degli MDM in pazienti in corso di HAART con un diverso recupero immunitario.....	49
○ La stimolazione dei TLR aumenta il rilascio/produzione di p24 nei pazienti con una risposta viro-immunologica completa alla HAART.....	50
• <i>Discussione</i>	51
PARTE III. Studio dei <i>reservoir</i> virali.....	53
• <i>Materiali e Metodi</i>	54
○ Reclutamento pazienti	54
○ Citofluorimetria	54
○ Separazione linfociti T CD4.....	55
○ Quantificazione HIV-DNA totale, integrato e 2-LTR	55
○ Saggio di riattivazione virale	57
○ Estrazione HIV-RNA	57
○ Quantificazione HIV-RNA	57
○ Misurazione livelli plasmatici di Interleuchina (IL)-2 e Interleuchina (IL)-7	58
○ Analisi statistiche.....	58
• <i>Risultati</i>	59
○ Caratteristiche dei pazienti in studio.....	59
○ I LTNP mostrano un fenotipo più attivato rispetto ai pazienti in corso di terapia antiretrovirale	59
○ I soggetti in terapia con diversa risposta immunologica e i LTNP non mostrano differenze nella distribuzione dei diversi subset T-linfocitari	60
○ L'entità dei reservoir di HIV sembra essere diversa nei pazienti in terapia rispetto ai LTNP.....	61
○ La quantità di DNA totale di HIV correla con l'attivazione delle cellule T CD4 e con la loro capacità di riattivare il virus dopo stimolazione	62
• <i>Discussione</i>	64
CONCLUSIONI GENERALI.....	66
BIBLIOGRAFIA.....	69
FIGURE E TABELLE.....	82

Introduzione

I. RUOLO DELL'ATTIVAZIONE IMMUNE NELLA PATOGENESI DELL'INFEZIONE DA HIV

1. Conseguenze dell'infezione da HIV sul sistema immunitario innato

Per molti anni, gli studi scientifici si sono concentrati sull'immunità specifica benché HIV danneggiasse inizialmente il sistema immunitario innato, quest'ultimo rivalutato dalla scoperta nel 1998 del TLR4 sui fagociti mononucleati, recettore specifico per il lipopolisaccaride o LPS. In questa linea di difesa un ruolo centrale è svolto dalla famiglia dei fagociti mononucleati, che comprende tre importanti sottogruppi [1].

- i fagociti o macrofagi fissi presenti nei vari tessuti e presentanti fenotipi tra loro variabili.
- le cellule dendritiche distinte in cellule di Langherans a livello epiteliale e cellule interdigitate o cellule dendritiche interstiziali nei tessuti non epiteliali; i loro precursori prendono il nome di cellule dendritiche mieloidi e cellule dendritiche plasmacitoidi o linfoidi;
- i monociti di derivazione midollare presenti nel sangue in grado di differenziarsi in macrofagi una volta raggiunto il tessuto bersaglio oppure in cellule dendritiche qualora stimulate da GM-CSF e da IL-4.

È importante sottolineare, che cellule dendritiche e macrofagi sono delle vere e proprie cellule presentanti l'antigene (APC) professionali, come anche i linfociti B, tuttavia tra i primi due sottogruppi vi è almeno una differenza sostanziale: le prime presentano l'Ag prevalentemente a linfociti T CD4 vergini (naive) che a loro volta si polarizzano in Th1; i secondi invece comunicano prevalentemente con linfociti T CD4 di memoria amplificando la risposta immunitaria locale. I ceppi M affini utilizzano come porta di ingresso proprio i membri della famiglia dei fagociti mononucleati in quanto essi si localizzano anche nei vari liquidi biologici come per esempio sperma, liquido vaginale e secrezioni cervicali. HIV è stato isolato infatti dalle cellule dendritiche del sangue periferico, dalle cellule di Langherans ed in alte percentuali dai macrofagi tissutali, ovvero nella maggioranza degli organi [2]. A conferma di ciò, mutazioni di CCR5 rendono i soggetti immuni alla trasmissione di HIV.

All'interno dei fagociti mononucleati la diffusione virale è favorita a seguito dell'interazione diretta con i linfociti T CD4, presenti nel mezzo locale, attraverso il contatto CD40-CD40L [1]. Anche le cellule dendritiche possono co-adiuvare la trasmissione virale, a prescindere se

siano infette, attraverso la presentazione di HIV sul DC-SIGN [3]: recettore di membrana CLR, C-type lectin receptor, espresso dalle cellule dendritiche immature e dalle cellule di Langherans. Infine HIV può essere isolato anche in monociti sebbene solo in piccole subpopolazioni [1]. Per queste ragioni i macrofagi e gli altri fagociti mononucleati rappresentano un vero serbatoio proteggendo il virus dalla risposta immunitaria e veicolandolo in santuari come il sistema nervoso [1]; inoltre, durante le fasi finali della storia naturale dell'infezione di HIV, a causa del numero ridotto di linfociti CD4 i macrofagi diventano il vero ed importante sito di replicazione di HIV.

In modo interessante, i monociti sono considerati ottimi marcatori per la misura del DNA provirale anche in soggetti con carica virale negativa sotto HAART [1]. HIV può danneggiare il sistema immunitario sia in modo indiretto che diretto (in quest'ultimo caso un ruolo importante è giocato da *Nef*, *Tat*, *Vpr* e *Vpu*). Danni indiretti possono essere legati al rilascio di sostanze in grado di influenzare l'attività delle cellule limitrofe oppure, a seguito di stimolazione di cellule infettate, attraverso il rilascio di fattori che agiscono sulle cellule immunitarie non infette limitrofe. Compatibilmente a questo modello le gp120 e gp41 inibiscono la chemiotassi monocitaria da chemochine nonché la fusione dei fagolisosomi dei macrofagi, il rilascio di IL-12 e l'attività delle cellule dendritiche di derivazione monocitaria [1].

Tra gli innumerevoli danni diretti bisogna ricordare: le alterazioni di espressione di molecole di superficie, quali CD14, MHC di classi I e TLR4 [1]; una riduzione della produzione di citochine, quali IL-12, TNF α [4, 5]; un aumento della produzione di chemochine [6]; un'inibizione di NF κ B [7]; un danno nella risposta alla produzione di INF di tipo I e II dopo stimolazione con CpG e una marcata alterazione della maturazione delle cellule dendritiche (successivamente al danno dei TLR) con diminuzione nell'espressione di molecole di superficie di membrana come MHC di classe I e II ma anche CD40, CD80 e CD86 oltre che produzione di citochine [8].

Altre anomalie riguardano le cellule dendritiche plasmacitoidi o linfoidi. Esse, che insieme alle cellule dendritiche mieloidi costituiscono i precursori delle cellule dendritiche, sono la fonte di produzione di INF di tipo I e IL-12 più importante dell'organismo [9]. Dopo interazione CD40-CD40L sono in grado di far differenziare i linfociti CD4 naive in Th2; in presenza di Ag virali invece sono in grado di guidare una forte risposta di tipo T helper I. Sotto stimolazione, attraverso la via dei TLR7 e TLR9 le cellule dendritiche plasmacitoidi rilasciano una enorme quantità di INF α , TNF α , IL-6 ed IL-8. Questa loro abilità è legata alla

presenza costitutiva dell'IRF7: il danneggiamento di questa via porta ad un danno per il sistema immunitario [1].

Uno studio ha riportato una diminuzione di numero delle cellule dendritiche plasmacitoidi ($CD11c^- CD123^+$) ed un aumento del loro grado di attivazione, maturazione e conseguente circolazione cellulare [10]. Si è visto come il mancato recupero delle cellule dendritiche plasmacitoidi fosse presente in quello stesso 20% di popolazione di HIV+ trattati che non recupera pienamente la conta dei CD4: in molti studi questo gruppo prende il nome di immunological non responders, INR [9]. L'altra popolazione di cellule dendritiche studiata è quella delle cellule dendritiche mieloidi ($CD11c^+ CD123^-$). Esse sono distinte in due sottogruppi: quelle di tipo I (poco conosciuta), e quelle di tipo II secernenti IL-12, IL-15 ed IL-18. Le seconde quindi hanno un ruolo per l'attivazione del braccio immunitario acquisito ma anche per il reclutamento delle NK. Entrambe queste ultime due sottopopolazioni, al contrario delle plasmacitoidi, recuperano numericamente sia negli INR che in tutti gli altri pazienti. Si può far risalire alle alterazioni del sistema immunitario innato anche il coinvolgimento, pertanto non trascurabile, del sistema nervoso centrale, soggetto ad alterazioni di cui non si conosce bene la causa ma che sembrano essere legate all'infezione virale delle cellule della microglia; fattori solubili infatti possono essere rilasciati in maggiore quantità quali IL-1, TNF- α ed IL-6. Gp41 può inoltre stimolare i neuroni a produrre NO. Nel danno neuronale sembrano implicati gli ioni Ca^{2+} con un eccesso di ingresso dai canali ionici attivati da glutammato.

2. Elevato turnover T linfocitario e marker di immunoattivazione

La disfunzione immunitaria con la deplezione dei CD4 è alla base della progressione clinica dell'infezione da HIV [2]. Il deficit della conta linfocitaria porta anche ad un conseguente deficit di cloni e questo spiega l'aumento di infezioni opportunistiche, direttamente per effetto citopatico del virus o indirettamente per i meccanismi spiegati precedentemente [2]. Tuttavia le anomalie riscontrate nella linea T linfocitaria vanno al di là delle semplici alterazioni numeriche: oltre a subire un danno quantitativo si registrano alterazioni di tipo qualitativo che sono oggetto di studio da alcuni anni. Il dato che emerge è la diretta conseguenza dell'elevato turnover delle cellule T, del rilascio citochinico, delle anomalie in sede linfonodale nonché dei corrispettivi stati morbosi di malessere generale e/o infezioni opportunistiche unite ad una anergia cellulare che predisponga a tali condizioni morbose. Tutto corrisponde ad un quadro di iperattivazione immunitaria ed il suo studio può aiutare a trovare una terapia in grado di

migliorare la qualità di vita dei pazienti e di superare anche problemi quali per esempio il pieno recupero della conta dei CD4⁺ durante la HAART. L'iperattivazione immunitaria può essere una diretta conseguenza della carica virale di HIV o della riattivazione di altri virus quali EBV-CMV (entrambi accompagnati da una iperattività T-cellulare e da una diminuzione delle difese dell'ospite precedentemente alla fase di latenza) oppure di meccanismi immunopatologici indipendenti da cariche virali. L'iperattivazione immunitaria sfocia in una anergia funzionale dei linfociti in quanto le cellule preattivate sono anche anergiche e non sono in grado di rispondere agli antigeni esterni. Inoltre l'iperattivazione può condurre ad un aumento di morte per apoptosi e quindi essere direttamente correlabile con la linfopenia più di quanto lo sia il virus con i suoi effetti citopatici diretti. Per queste ragioni si intuisce come essa sia responsabile indirettamente e direttamente della comparsa delle infezioni opportunistiche. L'iperattivazione, unita alla conta della linfopenia e della carica virale rappresenta una delle tre caratteristiche peculiari e rilevanti che caratterizzano l'infezione da HIV. Per studiare tale fenomeno è necessario tuttavia cercare dei marcatori di espressione cellulare che correlino con il grado di attivazione o proliferazione; il passaggio successivo è analizzare la distribuzione di tali marcatori, tra le differenti sottopopolazioni linfocitarie e non, in diversi gruppi clinici per giungere ad identificare la causa e quindi alla possibilità di una terapia.

Tra i marcatori di attivazione di superficie cellulare più studiati vi sono CD38, HLA-DR e Fas (CD95).

E' stato dimostrato che nei soggetti HIV-positivi vi sia un aumento dell'espressione di CD38 e HLA-DR sui CD4 e ancor di più sui CD8 rispetto al gruppo di controllo [11]; Fas aumenta invece soprattutto sui CD4 rispetto ai CD8 ma risulta invece fortemente elevato nei CD8 con fenotipo CD45R0+CD38+ (memory/effector). A questi valori si aggiunge la diminuzione delle cellule T con fenotipo CD45RA+ CD62L+, naive, sia CD4 che CD8 e l'aumento relativo, ma non assoluto, delle memory attivate, CD45R0+ CD4, rappresentando quest'ultimo un quarto marcatore di attivazione confermando i lavori precedenti. Gli stessi autori hanno descritto come la conta dei "doppi negativi", CD38- e HLA-DR-, sia direttamente proporzionale alla sopravvivenza di un soggetto HIV+ e che correli fortemente con l'evoluzione della patologia. Tra questi quattro marcatori di attivazione quello che meglio correla con una sopravvivenza breve, in assenza di trattamento, è CD38, sia sui CD4 che sui CD8 [11, 12]. Viceversa, un marcatore di lenta progressione corrisponde proprio ai singoli positivi per l'HLA-DR nei CD8 [11, 12]. Questi dati sono più affidabili nel prevedere la progressione della malattia se confrontati soprattutto con la sola conta dei CD4 oppure con la

carica virale: quest'ultima, tuttavia, è correlata con l'attivazione dei CD8 ma non dei CD4 [13]. In sintesi, non vi è alcuna correlazione tra la velocità di progressione della malattia e la conta dei naive CD4; la carica virale è correlata con l'attivazione dei CD8 ma non dei CD4; il fenotipo dei CD8 con HLA-DR+ CD38- è associato ad un basso grado di progressione e l'attivazione dei CD8 è correlata con un alto grado di progressione.

Un altro studio ha confermato, in soggetti HIV+, la diminuzione a livello linfonodale della sottopopolazione CD4 con inversione del rapporto e con aumento del fenotipo di CD8 e CD4 *effector*, senza riscontrare differenze per quanto concerne i fenotipi naive e memory [14]; tuttavia lo studio ha confermato una differenza significativa nell'espressione di Fas (CD95), ovviamente aumentato negli HIV+, ed un calo numerico delle cellule dendritiche mieloidi e plasmacitoidi [14].

Steven G Deeks e coll. hanno riscontrato una correlazione negativa tra i livelli di RNA plasmatico e la conta cellulare di CD4 in soggetti HIV+ non trattati; una correlazione positiva tra la carica virale e l'attivazione dei CD8 ma anche dei CD4; quindi una correlazione negativa tra tali attivazioni e la conta cellulare dei CD4 [15]. A questi dati bisogna aggiungere che è stata trovata una soglia, pari a 10.000 copie di RNA/ml, sotto la quale i CD8 dei pazienti non risultano particolarmente attivati ma superata la quale il grado di attivazione subisce un aumento significativo [15]. Tale attivazione declina in presenza di HAART essendo quest'ultima in grado di abbattere la carica virale a valori non rilevabili dal laboratorio [15]. Nonostante questo, il recupero della conta dei CD4 non è completo in tutti i pazienti probabilmente per via del grado di attivazione residuale con conseguente compromissione della proliferazione linfocitaria a livello timico [15].

Un passo successivo è stato compiuto da Jason M Brenchley e coll. i quali hanno ipotizzato che il continuo reclutamento di linfociti con successiva attivazione e morte per apoptosi comprometta maggiormente i linfociti CD4 rispetto i CD8, concordando con gli studi precedenti, e che vi fosse almeno un altro marcatore che rafforzasse tale tesi: Ki-67 [16]. I livelli di Ki-67, che indicano proliferazione, non ritornano ai livelli bassi dei soggetti HIV+ nemmeno durante HAART, per quanto, tuttavia, si registri un forte calo durante il trattamento farmacologico. Questo giustifica la tesi secondo la quale anche in assenza di carica virale, esattamente come avviene nei pazienti HIV+ sotto regime HAART, un livello di iperattivazione basale è sempre mantenuto.

Giulia Marchetti e coll. hanno riscontrato valori di Ki-67 più alti in un gruppo di soggetti HIV+ INR (Immunological Non-Responders) caratterizzati da $CD4 \leq 200/\mu L$ e HIV RNA < 50 copie/mL rispetto altri 2 gruppi dello studio quali i VNR, Virological Non-Responders, con

CD4 \geq 350/ μ L e HIV RNA \geq 10.000 copie/mL e i FR, full responders, con CD4 \geq 500/ μ L e HIV RNA \leq 50 copie/mL. Nello stesso studio si è visto come nonostante la carica virale sia soppressa negli INR vi siano valori di CD38/8 e di apoptosi sui CD4 simili a quelli dei VNR [17]. Anche qui i dati portano a conclusione che l'iperattivazione presente negli INR non è correlata alla carica virale ma ad altri fattori. Un'altra importante differenza che ha caratterizzato il gruppo degli INR è la presenza di un serbatoio più grande di CD4 memory [17].

Ki-67 si è dimostrato in diversi studi, tra cui quello più recente di Mette D. Hazenberg e coll. un importante marcatore di proliferazione; i suoi valori sono diverse volte più elevati nei linfociti dei soggetti HIV+ rispetto un gruppo controllo. Tali valori sono da 10 a 20 volte più elevati e riguarda tutte le popolazioni linfocitarie con la sola eccezione delle cellule CD8 effector per quanto anche in queste vi sia un trend a rialzo. La conta delle cellule naive CD4, e in misura minore anche dei naive CD8, risulta essere inversamente correlata con il valore di Ki-67 ma non con la carica virale. La conta dei CD4 memory risulta anch'essa inversamente proporzionale a quella del Ki-67 ma nel caso dei CD8 memory ed effector avviene esattamente l'opposto. In quest'ultimo caso infatti la proliferazione invece di accelerare le mitosi cellulari e portare le cellule verso uno stadio finale di apoptosi sembra aumentare il numero delle cellule mantenendole funzionali. Nello stesso studio si è dimostrato come il recupero cellulare più importante avvenga dopo sole quattro settimane di HAART. I pazienti trattati per un anno hanno mostrato un significativo recupero delle popolazioni CD4 memory e delle naive sia CD4 che CD8 ma assestandosi a livelli più bassi rispetto i controlli e comunque dipendendo in parte anche dal livello di base prima della terapia. I livelli delle memory e delle effector CD8 al contrario si sono abbassati pur soffermandosi su valori più alti rispetto i controlli. Parallelamente anche i valori elevati di Ki-67 han mostrato un cambiamento, in questo caso, in negativo: una rapida diminuzione nell'espressione di questo marcatore sui CD4 non accompagnata prontamente e simultaneamente però da un corretto recupero della conta cellulare.

Integrando questi dati con quelli degli studi precedenti emerge come la carica virale non sia necessaria per l'iperattivazione dei pazienti HIV per quanto essa stessa, da sola, possa determinarla. Tuttavia è anche possibile che i livelli di citochine, prodotte dai fagociti mononucleati in risposta o non all'infezione, contribuiscano al mancato recupero numerico dei CD4 o eventualmente li mantengano ad un grado di inattività funzionale. Interessante è la scoperta di una correlazione positiva tra la traslocazione microbica della flora batterica dal tratto gastroenterico al sangue, così come il passaggio di alcuni componenti come l'LPS, e

l'iperattivazione [18]: oggi si ritiene che quest'ultimo ne sia un marcatore affidabile. I TLR anche in questo caso sembrano coinvolti nella patogenesi da HIV, e quindi anche nell'iperattivazione [18, 19]: in uno studio è stato correlato un incremento di superficie di espressione del TLR2 sui monociti di pazienti HIV+ con aumento del TNF α [20]; un altro ha mostrato l'incremento di citochine quali IL-8, Mip-1 α e RANTES in seguito a stimolazione del TLR2 in PBMCs da soggetti HIV-infetti [6]; un altro ancora, l'aumentata espressione di TLR8 dopo stimolazione con ssRNA40, che mima HIV, con conseguente produzione di TNF- α e IL-10 [4]. Tutte queste ipotesi non si escludono a vicenda e possono coesistere in un unico complesso quadro di iperattivazione.

II. TRASLOCAZIONE MICROBICA IN CORSO DI INFEZIONE DA HIV

1. TLR: alterazioni in pazienti HIV+ e in HIV-

Richard T. Lester e coll. hanno dimostrato come nei soggetti HIV positivi, non trattati, non vi siano differenze, nei PBMC, in termini di espressione di mRNA dei TLR 1, 5, 9 e 10 rispetto i soggetti non infetti suggerendo un probabile non coinvolgimento di questi recettori e quindi escludendo un eventuale ruolo nella eziopatogenesi dell'HIV [4]. L'espressione dell'mRNA dei TLR 6, 7 e 8 è incrementata sia nel gruppo dei soggetti definiti "cronici", aventi $CD4 > 200$, che in quelli definiti "AIDS", con $CD4 < 200$, rispetto un gruppo controllo [4]; il TLR6 ha avuto la peculiarità di essere significativamente più espresso nel sottogruppo AIDS [4]. I TLR7 e 8 quindi si mostrano marcatori aspecifici per tutti soggetti HIV rispetto ai negativi e questo è perfettamente concorde con la responsività a frammenti virali quali quelli di HIV [4]. L'mRNA dei TLR2, 3 e 4 invece è aumentati soltanto nel sottogruppo AIDS mostrandosi quindi come marcatori specifici per stadi avanzati di malattia a cui si può aggiungere il TLR6 che tuttavia, come riportato precedentemente, risulta espresso, seppure in misura minore, anche nei cronici [4]. Questi ultimi tre marcatori, essendo correlati con risposte innate contro altri patogeni, mostrano un'interessante relazione con lo stadio avanzato di malattia e quindi con le infezioni opportunistiche: il loro aumento potrebbe rappresentare una risposta a continui stimoli infettivi non legati ad HIV. L'aumento dei TLR6 e 7 fu positivamente correlato alla carica virale, ma anche quella del TLR4 aveva un orientamento in senso positivo[4]. Correlazioni positive sono state trovate anche per i TLR2, 3 e 8 seppure non con differenze statisticamente significative [4]. Questo ci porta a concludere che la carica virale ha, in questo caso, un ruolo nel mantenimento di questo quadro fenotipico. Studiando in particolar modo i TLR8 e il TLR4, con i loro ligandi immunologici, si è mostrato come la stimolazione con un analogo di HIV nei soggetti non infetti determini un aumento di espressione importante sia del TLR8 che del TLR4 (soprattutto per il TLR8 che è il suo "recettore immunologico" naturale) mostrando un'interessante cross-espressione fisiologica, mentre negli HIV+ si è registrato un aumento del TLR8 ma non del TLR4 (anche se non si conosce a quali dei 2 sottogruppi rientrano i soggetti infetti) [4]. Tale mancata risposta deve essere ancora analizzata e compresa; è probabile che il virus, stimolando continuamente la via del TLR8, determini indirettamente un'alterazione della via del TLR4 essendoci vie di trasduzione del segnale in comune; in alternativa è possibile che vi siano meccanismi

indipendenti da HIV che portino ad una mancata attivazione. Stimolando gli stessi recettori con l'LPS si è visto che i soggetti HIV- mostravano una diminuzione dell'mRNA del TLR4 ed una sostanziale assente risposta del TLR8 (con un leggero trend a rialzo) confermando il non coinvolgimento della via del TLR8 in un soggetto sano che risponde normalmente all'LPS mentre, questo stesso stimolo, nei soggetti HIV+ ha mostrato un'assente risposta del TLR4 (o comunque una non diminuzione) ed un interessante aumento significativo del TLR8 [4]. Il fatto che l'LPS stimoli indirettamente l'espressione dell'mRNA del TLR8 è un ulteriore segnale di una alterazione nel *signaling*. La diminuzione dell'espressione dell'mRNA contrasta con uno studio fatto sui topi in cui invece non si evidenziavano alterazioni quantitative [21].

Quindi in sintesi:

- analoghi di HIV: stimolano l'espressione di superficie di entrambi i recettori (cross-espressione) nei positivi; solo TLR8 nei negativi.
- l'LPS riduce l'espressione del TLR4 (TLR8 invariato) nei negativi ma stimola il TLR8 (mentre resta invariato sul TLR4) nei positivi.

Per capire se l'aumento dell'espressione dell'mRNA del recettore sia correlato con la perdita e/o difetto di trasduzione del segnale si è andati a valutare l'induzione di citochine, in soggetti HIV+ e soggetti HIV-, misurando il TNF- α e IL-10 stimolati con LPS e frammenti virali simil-HIV. Per entrambi i ligandi c'è stato un aumento di TNF- α e IL-10 rispetto i soggetti HIV-, con valori più alti per il TNF- α indicando un aumento dell'attività dei TLR, quindi della trasduzione del segnale, e delle citochine prodotte soprattutto TNF- α [4]. I soggetti trattati avevano, sui PBMC, normali espressioni dell'mRNA per i TLR2-3-4-6 e 8 sebbene il TLR7 restasse elevato nei soggetti trattati rispetto i non infetti per quanto stabilizzandosi ad un setpoint più basso. Tale calo è verosimilmente correlabile con la diminuzione della carica virale ma non con la ricostituzione immunologica in quanto i pazienti che avevano cominciato la terapia da un anno erano partiti da uno stadio avanzato [4].

In uno studio che ha analizzato e confrontato dati provenienti da tre gruppi differenti, monoinfetti HIV/monoinfetti HCV e co-infetti, si è indirettamente confermato il funzionamento della risposta della via TLR4 sotto stimolo delle PBMC con LPS soprattutto nel primo gruppo [22]; l'attività secretoria citochinica della via del TLR4, come anche del TLR3, è risultata, sotto stimolo, persino superiore rispetto gli altri due gruppi e ovviamente rispetto i controlli negativi [22]. Questo dato è stato inaspettato in quanto la secrezione basale spontanea nel surnatante di PBMC nei pazienti HIV monoinfetti di citochine, quali IL-6, è

stata più bassa rispetto i monoinfetti HCV e i co-infetti anche se più alta rispetto gli HIV⁻[22]. Comportamento analogo per l'IL-1 β ma meno pronunciato: valori elevati riscontrati soltanto nel gruppo dei monoinfetti HCV[22]; lo stesso dicasi per TNF α : valori superiori e statisticamente significativi nei co-infetti rispetto il gruppo controllo e i monoinfetti HIV [22]: questi ultimi non mostravano alcuna differenza con il gruppo controllo [22]. Da questo studio si deduce come nei soggetti HIV⁺ non vi siano enormi differenze in termini di secrezione basale di citochine rispetto gli HIV⁻ fatta eccezione per un leggero trend a rialzo per l'IL-6; resta invece il dato saliente sulle differenze in termini di produzione di citochine dopo risposta con rispettivi ligandi dei TLR, in particolare TLR4, che evidenzia come vi sia una alterazione almeno dal punto di vista qualitativo e che quindi HIV sia responsabile, in modo diretto o indiretto, di tale condizione [22].

Funderburg e coll. tra i primi, hanno lavorato sul funzionamento dei TLR nei linfociti. A cosa servano i TLR sui linfociti non è stato ancora completamente chiarito; resta certa la loro presenza anche a livello linfocitario con un possibile ruolo, quindi, in merito all'immunità acquisita; con conseguenti alterazioni in HIV. Lo studio di Funderburg riporta come nei linfociti di soggetti HIV⁻ la stimolazione dei TLR con i loro corrispettivi ligandi ha portato ad una attivazione cellulare con conseguente aumento di CD38 dopo 24h di coltura cellulare sia per i CD4⁺ che per i CD8⁺: nel caso specifico con l'LPS, dopo stimolazione con tale ligando, dai valori basali di espressione di CD38 intorno al 4,3% per i CD4⁺ e al 2,1% per i CD8⁺ si è giunti a valori, rispettivamente, di 26% e 31,3% [23]. Dopo sette giorni di stimolo (T7) con i vari ligandi dei TLR si è andati a valutare l'espressione di due importanti marker: Ki-67, sinonimo di proliferazione già discusso nei capitoli precedenti; CD69, marker implicato nella ritenzione a livello linfonodale dei linfociti T attivati e quindi di attivazione T linfocitaria precoce [23].

A T7 si sono presentati due pattern di citofluorimetria:

- un aumento di Ki-67 prevalentemente sui CD4 con quasi tutti i ligandi (con un trend a rialzo anche per l'LPS anche se non significativo) ed un aumento meno accentuato nei CD8 (soprattutto per i TLR2-1-6, TLR3, TLR5, TLR7/8 e TLR9): questi dati portano a conclusione che i CD4 entrano più facilmente in ciclo, se stimolati con i ligandi dei TLR, rispetto i CD8 [23].
- un aumento di CD69 prevalentemente sui CD8 con tutti i ligandi ma con risposte pronunciate, soprattutto, per TLR3 e per TLR7/8 ed un inconsistente trend a rialzo per i CD4 con significatività per soli due TLR (TLR5 e TLR7/8): questi dati

portano a conclusione che i CD8 permangono a livello linfonodale più frequentemente dei CD4 [23].

Valutando le tre sottopopolazioni, naive/memory/effector: per quanto riguarda i CD4 si è osservato una scarsa espressione di Ki-67 per la prima sottopopolazione rispetto alle altre due con la sola eccezione del TLR3 [23]; per i CD8 il fenotipo effector è stato quello più coinvolto nell'espressione di CD69 con le sole eccezioni dei TLR3 e TLR7/8 che invece hanno mostrato un coinvolgimento totale [23]. È importante sottolineare come questi risultati, in vitro, siano stati ricavati da soggetti HIV⁻ in salute: sarebbe utile valutare, con gli stessi parametri, le risposte dei linfociti di pazienti HIV⁺ ed eventualmente scoprire anche eventuali differenze nei vari gruppi subclinici, Advanced naive, naive, INR e FR.

Alla luce di questi studi sul funzionamento dei TLR è possibile riepilogare quanto segue:

- HIV inibisce l'NF-κB determinando un'alterazione importante al sistema immunitario innato, attraverso i TLR, sia nella integrità del sistema dei fagociti con il danno del burst ossidativo, sia nella maturazione delle cellule dendritiche e quindi danneggiando la loro funzione di APC professionali con potenziale deficit di attivazione della risposta immunitaria acquisita [8, 19].
- HIV determina, in altri studi, un aumento dell'espressione dell'RNAm dei TLR dei PBMC nei soggetti non trattati con diversificazione a seconda delle condizioni cliniche: vi è aumento dei TLR6, TLR7/8 in tutti i soggetti infetti rispetto il gruppo controllo [4, 24]; vi è aumento dei TLR2, TLR3 e TLR4 soltanto in quelli con stadi avanzati e aumento del TLR6 anche rispetto i soggetti non in stadio avanzato; nessuna variazione per i TLR1, TLR5, TLR9 e TLR10 [4, 24]. Correlazioni strette con la carica virale per i TLR6, TLR8 e in parte per il TLR4; legami meno forti con la carica virale per gli altri tre TLR [4]. Ritorno alla normalità in caso di trattamento con la sola eccezione per TLR7. Altri dati emersi sull'mRNA: aumento del TLR8 nei soggetti sani, aumento del TLR4 e del TLR8 nei soggetti HIV⁺ se stimolato con analoghi di HIV [4]; diminuzione del TLR4 nei soggetti sani, diminuzione del TLR8 nei soggetti HIV⁺ se stimolati con LPS (non si conoscono le dinamiche degli altri TLR con gli altri ligandi) [4].
- Aumento del TNF-α e dell'IL-10 rispetto il gruppo controllo se stimolati con analoghi di HIV e con LPS dai PBMC; aumentata produzione citochinica di importante rilievo, sotto stimolo con ligandi dei TLR3 e TLR4 (LPS), dai PBMC (con lieve aumento di produzione di IL-6 al basale) nei soggetti HIV⁺ rispetto il gruppo controllo[4].

- Aumento dell'espressione di CD38 sia per i CD4⁺ che per i CD8⁺: nel caso dell'LPS dai valori basali di 4,3% per i CD4 e 2,1% per i CD8 si è giunti a valori, rispettivamente, di 26% e 31,3% in modello HIV- [23].
- Aumento dell'espressione di Ki-67 prevalentemente sui CD4 con quasi tutti i ligandi (con un trend a rialzo anche per l'LPS anche se non significativo) ed un aumento meno accentuato nei CD8 (soprattutto per i TLR2-1-6, TLR3, TLR5, TLR7/8 e TLR9) in modello HIV [23].
- Aumento dell'espressione di CD69 prevalentemente sui CD8 con tutti i ligandi ma con risposte pronunciate, soprattutto, per TLR3 e per TLR7/8 ed un inconsistente trend a rialzo per i CD4 con significatività per soli due TLR (TLR5 e TLR7/8): questi dati portano a conclusione che i CD8 permangono a livello linfonodale più frequentemente dei CD4 in modello HIV [23].

Quindi per i CD4 si analizza il seguente pattern in modello HIV: attivazione (CD38), proliferazione (Ki-67) con scarso coinvolgimento delle naive e bassa permanenza a livello linfonodale (CD69). Per i CD8: attivazione (CD38), scarsa proliferazione (Ki-67) ed elevata permanenza a livello linfonodale (CD69) [23].

2. Traslocazione microbica in corso di infezione da HIV e nell'immunoricostruzione in corso di HAART

Nello studio di Jason M. Brechley e coll. i soggetti HIV+ "cronici" e quelli con CD4<200/ μ L "AIDS" hanno registrato livelli di LPS ematico più alti rispetto gli individui non infetti ma anche quelli infetti da sole 4 settimane [18]. Si pensa che l'LPS crei un danno immunologico che possa giustificare o essere la concausa sia dell'iperattivazione, negli stadi avanzati e non, che nella mancata risposta alla HAART degli INR. Essendo i valori di LPS elevati, la fonte non può che includere batteri commensali, patogeni (ma che non determinano manifestazioni cliniche) e infezioni opportunistiche: bisogna specificare che le discussioni sull'LPS contemplano soltanto quello di origine intestinale ovvero l'LPS enterobatterico tralasciando volutamente quello di origine non enterobatterico. Dopo trattamento antibiotico di durata 2 settimane la carica batterica nelle feci era diminuita e così anche la concentrazione di LPS dimostrando la provenienza intestinale dell'LPS [18]; tuttavia il calo era evidente dopo una settimana ma a partire da questa, e durante il trattamento, si è registrato un aumento di LPS proveniente da altre specie batteriche. Non è necessaria la presenza di batteri nel sangue: l'LPS può superare direttamente la barriera gastrointestinale come frammento singolo. Il passaggio dal lume intestinale al torrente ematico di LPS o di batteri G- è chiamato

traslocazione microbica. Nello studio, comunque, sono stati esclusi pazienti in AIDS e/o quelli che superavano soglie di batteriemie importanti vicine a quadri di sepsi. Per spiegare questo anomalo aumento ematico di LPS si è giunti a due ipotesi: la prima contemplava l'idea di un danno mucosale che inizi dopo le prime 4 settimane di infezione [18]; la seconda che vi sia un cambiamento dei fattori che controllano l'LPS. I livelli di sCD14 e di LBP sono aumentati già fin dalle primissime fasi (con un aumento maggiore nei cronici), rispetto i non infetti [18]; tale aumento è lineare: sembra che l' LPS stimoli i monociti a rilasciare i sCD14; i dati in vitro, rispetto quelli in vivo, sono comunque contrastanti in quanto c'è una correlazione inversa tra l'attività dei monociti e il grado di risposta all'LPS. Il CD14 solubile dei monociti, sCD14, lega l'LPS, TNF- α e IL-1 sotto stimolo dell'LPS stesso; vi è tuttavia anche l'LBP che lega l'LPS e che è prodotto dalle cellule epatiche e gastrointestinali in risposta all'LPS. In condizioni normali, nei soggetti non infetti ed in salute, ci sono anticorpi, IgM, IgG ed IgA, che neutralizzano il core dell'LPS detti *EndoCAB*. Tali anticorpi durante la fase acuta di endotossinemia si legano all'LPS, che è in concentrazione normale nell'intestino ma con una elevata traslocazione dovuta all'aumento dei CD14 solubili, per neutralizzarlo per poi ritornare allo stato naturale alla fine dello stimolo. Tuttavia nelle fasi precoci dei soggetti infetti ci sono titoli più bassi di tali anticorpi rispetto i soggetti non infetti e tali titoli diminuiscono ancor più nei cronici [18]. Vi è una correlazione inversamente proporzionale tra LPS e anticorpi nel sangue [18]; inoltre l'assenza di anticorpi, che sono presenti anche negli individui affetti da malattie croniche infiammatorie intestinali, potrebbe essere spiegata dalla disfunzione dei linfociti B. Vi è anche una correlazione positiva tra LPS plasmatico e INF α la cui fonte sono le cellule dendritiche plasmacitoidi [18]; tuttavia l' LPS non sembra la causa di questo aumento. Non sono stati osservati livelli aumentati di TNF e IL-1 tranne che in alcuni studi e soltanto nei soggetti in AIDS o con sole infezioni opportunistiche. L'iporesponsività riscontrata in vitro è determinata dalla cronica stimolazione dei TLR e non da altre vie perché i monociti hanno risposto al TNF e all'INF α . HIV potrebbe stimolare direttamente i TLR quali TLR7 dei pDC ma non vi è correlazione tra la carica virale e i livelli di INF α . È stata trovata una correlazione positiva tra i livelli di LPS e la frequenza di circolazione dei CD8+ che avevano un fenotipo HLA-DR+CD38+ in una coorte di HIV- e HIV+ cronici e tale aumento è stato trovato anche unendo i due sottogruppi di HIV cronici e in AIDS ma partendo, ovviamente, da valori più alti [18]. È stato possibile indurre bassi livelli di attivazione di cellule T, B e monociti da colture di linfociti di HIV non infetti con plasma di HIV infetti con LPS elevato. La HAART decrementa l'iperattivazione T linfocitaria sebbene con risultati meno brillanti rispetto all'azione svolta sulla carica virale. La ricostituzione delle

difese potrebbe permettere un loro aumento anche a livello mucosale: questo spiegherebbe la diminuzione dell'LPS dopo inizio di terapia parallelamente all'aumento dei CD4 [18]. Tuttavia questi parametri non sono correlati linearmente ponendo un problema in termini di interpretazione dell'intero sistema "traslocazione microbica/ricostituzione immunologica/replicazione di HIV. Infatti i valori di LPS restano al di sopra nei soggetti HIV anche se trattati rispetto ai non infetti suggerendo che la traslocazione microbica potrebbe ancora avvenire sebbene a valori più ridotti probabilmente per una non completa ricostituzione mucosale [18]. A conferma di questi valori di LPS che persistono più elevati vi sono i CD14s non modificati dopo 48 settimane di terapia nonostante la carica virale fosse negativa [18]; inoltre gli EndoCAb rimangono più bassi nonostante una parziale diminuzione delle anomalie B cellulari. I livelli di LPS sono più bassi nei soggetti non progressor "long term": essi presentano un grado di attivazione immunologica più basso ma più alto rispetto ai non infetti [18]. Quindi anche tali individui hanno traslocazione microbica e danno mucosale con deplezione dei CD4 mucosali e danno epiteliale intestinale però i livelli dei CD14s e di LBP sono più bassi e gli anticorpi più alti rispetto ai cronici, tuttavia tali anticorpi non diminuiscono all'aumentare dell'LPS.

III. RESERVOIR VIRALI IN CORSO DI INFEZIONE DA HIV

1. Come si instaura e si mantiene la latenza

L'introduzione della terapia antiretrovirale ha ridotto drasticamente la replicazione di HIV nella maggior parte degli individui HIV-infetti, con una conseguente diminuzione di morbilità e mortalità [25, 26]. Tuttavia l'entusiasmo seguito a questa scoperta è stato smorzato verso la metà degli anni '90 in seguito alla pubblicazione di tre diversi studi indipendenti in cui è stata dimostrata la persistenza di un piccolo ma comunque rintracciabile gruppo di cellule infettate in modo latente (CD4 *resting*) in grado di promuovere e sostenere la replicazione di HIV proprio in quei pazienti in cui la HAART era risultata efficace da un punto di vista virologico [27-29]. Un certo numero di studi ha poi dimostrato una rapida ripresa della replicazione virale poco tempo dopo la sospensione della terapia [30, 31], mettendo in discussione la capacità della HAART da sola di eradicare il virus.

Ad un primo studio del 1995 in cui veniva dimostrata per la prima volta la presenza di cellule infettate in modo latente (CD4 *resting*) in grado di mantenere al loro interno HIV-DNA integrato, ne seguirono altri volti ad analizzare in modo più dettagliato la frequenza di tali cellule e la loro capacità di produrre virus in seguito ad attivazione cellulare nel sangue e nei tessuti linfoidi di soggetti infetti non trattati [32].

I CD4 *resting* infettati in modo latente hanno un fenotipo prevalentemente di memoria (CD45R0+), indicando che tali cellule infettate possono vivere a lungo, e possono trasportare un virus infettivo senza esprimere sulla superficie antigeni virali, per sfuggire al riconoscimento da parte del sistema immunitario [32].

Sebbene l'infezione dei CD4 *resting* sia difficoltosa *in vitro*, a causa dei molteplici blocchi del ciclo vitale del virus, ad oggi sono state proposte due principali teorie sull'instaurarsi della latenza:

- (i) le cellule latentemente infette si originano a seguito della sopravvivenza di cellule infettate attivate che reversiono ad uno stato di quiescenza [33].
- (ii) la latenza si stabilisce dopo un'infezione diretta delle cellule CD4 *resting*, in assenza di attivazione delle cellule T [34].

E' stato dimostrato che HIV si integra principalmente all'interno di geni attivi da un punto di vista trascrizionale [35]. Lo stato trascrizionale del genoma di HIV integrato è controllato in parte dalle modificazioni della struttura cromatinica delle regioni circostanti alle LTR. In particolare, gli istoni acetilati possono reclutare attivatori trascrizionali, mentre la rimozione dei gruppi acetili da parte delle iston de-acetilasi (HDAC) favorisce la formazione di strutture

cromatiniche repressive più compatte [35]. Azione analoga è svolta dalle metil-transferasi (HMT) che reprimono la trascrizione a livello delle LTR di HIV .

Il virus si localizza all'interno di reservoir quali:

- Cellule T di memoria: le cellule di memoria centrale e le cellule di memoria di transizione sono state recentemente descritte come le principali cellule infettate che persistono in circolo in soggetti in corso di HAART [36]
- Cellule T naive: HIV-DNA è in grado di persistere all'interno di cellule CD4 naive di pazienti in terapia, sebbene la frequenza dell'infezione sia approssimativamente 1-2 log meno rispetto alle cellule di memoria [32]
- Progenitori ematopoietici: studi recenti hanno dimostrato che HIV persiste all'interno di cellule progenitrici ematopoietiche, CD34+ [37]
- Astrociti: in studi *in vitro*, l'infezione di linee cellulari astrocitarie hanno portato ad un'integrazione, ma una produzione virale marginale, a conferma di un modello di infezione latente. HIV-DNA integrato è stato trovato all'interno di astrociti di pazienti HIV-infetti e si associa a demenza [38, 39]
- Tratto Gastrointestinale (GI): GI rappresenta sicuramente un importantissimo reservoir di HIV nei pazienti infetti in corso di HAART. In tale sito anatomico sono state trovate concentrazioni di HIV-RNA unspliced e HIV-DNA 5-10 volte maggiori rispetto a quelle ritrovate nelle PBMC [40, 41]. La distribuzione varia lungo il tratto GI, con concentrazioni più alte di HIV-DNA nel retto e concentrazioni più alte di HIV-RNA unspliced nell'ileo [41].
- Sistema Nervoso Centrale (SNC): il SNC rappresenta un serbatoio di HIV nei pazienti in terapia, poichè la barriera ematoencefalica limita l'accesso dei farmaci alle cellule dell'immunità specifiche per HIV. Gli astrociti infettati in modo latente e i monociti infetti rappresentano potenziali reservoir virali nel cervello e bassi livelli di HIV-RNA sono stati riscontrati nel 10% dei pazienti in corso di HAART [42].
- Tessuti linfoidi: i CD4 *resting* contenenti HIV-DNA integrato circolano attraverso i vasi sanguigni fino ai linfonodi, facendo dei tessuti linfoidi un importante, sebbene poco studiato, reservoir virale nei pazienti in terapia. Le cellule follicolari dendritiche o altre cellule mieloidi residenti nei centri germinativi potrebbero fornire una riserva stabile di virus [43].
- Tratto genito-urinario. HIV-RNA è stato rintracciato nel seme dell'8-10% della popolazione maschile e nelle secrezioni genitali del 54% della popolazione femminile in trattamento antiretrovirale [44], suggerendo che anche il tratto genitale è un

reservoir di HIV, sebbene non sia chiara l'esatta fonte di provenienza del virus. Come per il SNC, la penetrazione della HAART in questo sito è limitata [45] e nel tratto genito-urinario maschile, soprattutto nei testicoli, la barriera presente limita l'ingresso delle cellule del sistema immunitario [46]. Studi *in vitro* hanno dimostrato che il tessuto testicolare è in grado di supportare l'infezione produttiva del virus [47].

La vita media dei reservoir era stata inizialmente stimata intorno ai 44 mesi [48], pensando che fosse conseguenza della lunga vita media delle cellule T di memoria quiescenti. Recenti evidenze, tuttavia, sembrano suggerire che altri fattori contribuiscono alla persistenza di cellule latentemente infette, tra cui la soppressione dell'attivazione T-cellulare, la proliferazione omeostatica e/o l'immuno-attivazione.

Proprio la mancanza di consenso sulla durata temporale di tali reservoir ha suscitato negli ultimi anni un intenso dibattito riguardo la possibilità che bassi livelli di replicazione di HIV in un sottogruppo di CD4 all'interno dei tessuti linfoidei possa contribuire alla ricostituzione delle cellule CD4 latentemente infette [49, 50]. Tramite questo meccanismo la complessiva vita media dei reservoir virali sarebbe pressochè infinita.

2. Strategie terapeutiche per l'eradicazione dei reservoir virali

Uno degli obiettivi principali della ricerca sull'HIV degli ultimi anni è stato lo sviluppo di strategie cliniche volte ad eliminare il virus negli individui infetti in corso di HAART. La ricerca di una cura per il virus HIV è cominciata più di un decennio fa con strategie che direttamente o indirettamente stimolavano le cellule infettate in modo latente, cioè i CD4 *resting*.

Questi studi si basano sull'ipotesi secondo cui l'attivazione dei reservoir virali comporterebbe una morte cellulare rapida dovuta agli effetti citopatici di HIV e il virus rilasciato da queste cellule attivate sarebbe controllato dalla concomitante somministrazione di HAART.

A tal proposito, numerosi sono gli studi atti ad identificare agenti in grado di riattivare il virus e quindi di eradicare la malattia. Le principali strategie di eradicazione si basano su approcci farmacologici per eliminare le cellule latentemente infette o sulla terapia genica per rendere le cellule resistenti al virus HIV [51].

Gli approcci farmacologici maggiormente studiati sono i seguenti:

- **Inibitori delle iston-deacetilasi (iHDAC)**

Il primo iHDAC, usato per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T (CTCL), vorinostat (suberoilamide idrossamica acido, SAHA), ha una grande capacità di

riattivare *in vitro* cellule latentemente infette e *in vivo* i CD4 quiescenti di pazienti HIV-positivi in terapia virologicamente efficace [52]. Attualmente ci sono due studi clinici di vorinostat in pazienti HIV-infetti che mirano a determinare la capacità di tale composto nell'attivare il virus *in vivo* [52, 53].

Molti altri iHDAC sono in fase 2 o 3 per il trattamento del cancro, tra cui panobinostat, entinostat, e gavinostat. In modo interessante, comparando la capacità delle molecole di indurre attivazione del virus, è visto che sia i pan-iHDAC (vorinostat e panobinostat) sia gli inibitori specifici di HDAC1 (entinostat) potrebbero riattivare HIV con un'efficacia simile, ma con gradi di tossicità differenti [48]. Molti nuovi iHDAC, che attivano il virus *in vitro*, non sono ancora stati valutati in studi sugli uomini; tra questi vi sono CG05 e CG06 [54], oxamflatina, MCT-1 e MCT-3 [55], una gamma di composti Merck (designati MRK 1, ecc) [56], e NCH-51 [57]. È importante però tenere presente quando si valuta lo sviluppo pre-clinico di questi composti, che i diversi iHDAC agiscono in modo differente a seconda della linea cellulare usata *in vitro* [58].

○ Inibitori della metilazione

Le estremità 5' delle regioni LTR di HIV contengono motivi CpG che sono metilati durante

l'infezione latente e contribuiscono al mantenimento della latenza mediante il silenziamento trascrizionale. Gli inibitori delle DNA metiltransferasi (iDNMT) sono quindi potenzialmente in grado di riattivare l'infezione latente di HIV. Studi sull'iDNMT 5-aza-2'deoxycitidina (5-aza-dC) *in vitro* hanno mostrato effetti variabili a seconda della linea cellulare [59], tuttavia, si è visto un effetto sinergico di 5-azadC e vorinostat nel riattivare l'HIV *ex vivo* in cellule CD4 di pazienti in sottoposti a terapia soppressiva.

○ Modulatori della proteina chinasi C (PKC)

L'attivazione della PKC, tramite prostratina, ha un potente effetto attivatorio su HIV latente *in vitro* [60]. Utilizzando tale molecola in combinazione con vorinostat, tricostatina A (TSA), o sodio butirato si è visto un effetto sinergico [61, 62]. Tuttavia, poiché prostratina è agente attivatore aspecifico e non è mai stata somministrata agli uomini, non è chiaro se tale molecola verrà effettivamente testata in studi clinici. Recentemente, è stato dimostrato un effetto di bryostatina nel riattivare HIV mediante l'attivazione delle vie di trasduzione del segnale di PKC e di 5'adenosine monofosfato chinasi attivata (AMPK) [63].

Al contrario, inibitori della PKC come rottlerin, il cui target specifico è PKC θ selettivamente espressa in cellule T, sembrerebbero avere una promettente azione nel limitare la replicazione di HIV, limitando quindi le dimensioni della reservoir se somministrato durante l'infezione primaria [64].

- Citochine

Le citochine IL-7 e IL-15 che sono coinvolte nell'omeostasi T-linfocitaria sono anche in grado riattivare HIV [65]. Wang e colleghi hanno dimostrato che IL-7 aumenta in modo efficiente la produzione di HIV dai CD4 *resting* dei pazienti HIV-infetti in corso di terapia antiretrovirale [66]. Inoltre, la somministrazione di IL-7 nei pazienti in corso di HAART è stata associata ad un lieve aumento plasmatico di HIV RNA [67].

In altri modelli *ex vivo*, IL-7 ha mostrato una potenza limitata nel riattivare HIV, mentre IL-15 è stata in grado di indurre un'abbondante produzione di virus, attraverso l'induzione del differenziamento dei CD4 di memoria centrale in CD4 di memoria effettori [68].

- Immunomodulatori

Dato che vi sono molteplici fattori immunologici importanti nel mantenimento della latenza, è ipotizzabile che interferendo con alcuni di questi meccanismi sia possibile in linea teorica eliminare queste cellule latentemente infette.

Anti-PD-1 è attualmente in corso di valutazione per il trattamento del cancro [69] e se dimostrato sicuro, nel giro di pochi anni potrebbero iniziare anche studi in pazienti HIV-infetti in corso di HAART.

L'antibiotico minociclina è capace *in vitro* di alterare l'ambiente cellulare, portando alla soppressione dell'attivazione delle cellule latentemente infette e potrebbe potenzialmente essere usato per ridurre il rilascio di HIV da tali cellule [70].

Potrebbe esserci spazio anche per composti che riducono l'attivazione immunitaria, sebbene il rapporto tra attivazione immunitaria e persistenza di HIV necessiti di una migliore comprensione [71]

IV. RUOLO DELLA HAART NELL' INFEZIONE DA HIV

1. Immunoricostruzione in corso di HAART

L'introduzione e l'impiego su larga scala della terapia antiretrovirale ad alta efficacia (HAART) nel trattamento dell'infezione da HIV-1, ne hanno drasticamente modificato la storia naturale [72].

I trattamenti attuali comprendono tre farmaci, quali inibitori della trascrittasi inversa non nucleosidici (NNRTI) o nucleosidici (NRTI) e inibitori della proteasi (PI). Altri antivirali in studio includono inibitori dell'integrasi, farmaci diretti contro l'*envelope* virale, farmaci diretti contro i co-recettori del virus ed altre proteine.

L'efficacia dei farmaci antiretrovirali nel determinare una riduzione della replicazione di HIV-1 comporta una progressiva rigenerazione del compartimento i linfociti T CD4, il cui deterioramento quantitativo così come funzionale rappresenta l'elemento cardine dell'immunodeficienza HIV-correlata. Il graduale ripristino della competenza immunitaria si associa alla riduzione del rischio di infezioni opportunistiche, di progressione ad AIDS e di morte.

Diversi studi hanno evidenziato gli effetti cellulari e molecolari che si verificano a seguito di un trattamento con terapia antiretrovirale. In particolare, le principali modifiche che si osservano sono: diminuzione della carica virale, aumento del numero di cellule T CD4 a fenotipo *memory*, aumento, in un secondo tempo, del numero di cellule T CD4 a fenotipo *naive*, diminuzione dei marcatori di attivazione sulle cellule T CD4.

1) effetto sulla carica virale

Entro 16 settimane dall'introduzione della terapia si osserva una marcata diminuzione della carica virale plasmatica, che resta stabile al di sotto della soglia di rilevazione delle comuni metodiche nella maggioranza dei pazienti .

2) effetto sul comparto *memory*

Già dopo le prime due settimane di HAART si osserva un rapido aumento della conta dei linfociti, soprattutto a carico delle cellule T CD4, che aumentano di due volte. Durante i successivi 12 mesi si osserva un ulteriore, se pur lento, aumento delle cellule CD4, mentre la conta dei CD8 registra una progressiva diminuzione. Nel corso dei primi 4 mesi tutti questi cambiamenti sono prevalentemente a carico delle cellule T CD4 *memory*, definite tali dall'espressione dell'isoforma CD45R0.

3) effetto sul comparto *naive*

L'incremento delle cellule T CD4⁺ *naive* avviene invece in tempi successivi, dopo almeno 4 mesi di terapia, in seguito ai quali si osserva un aumento del pool CD45RA⁺ con iniziale bassa espressione di L-selectina, che aumenta però in un secondo momento. La HAART provocherebbe quindi una diminuzione dell'attività di HIV, che revertirebbe il fenomeno di attivazione cellulare cronica, consentendo l'espansione delle cellule T CD4 e il ridimensionamento del comparto CD8.

4) effetto sull'attivazione T-linfocitaria

I due picchi di aumento delle cellule T CD4 *memory* e *naive* sono associati alla diminuzione dell'espressione dei marcatori di attivazione cellulare. Infatti, durante tutto il primo anno di terapia si osserva un continuo decremento di cellule CD4 HLA-DR⁺, ovvero di cellule attivate che espongono il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II. Anche l'espressione di CD38 tende a diminuire nel corso del trattamento, sia sulle cellule T CD4 che sulle CD8.

2. Risposte discordanti alla HAART

L'introduzione su larga scala di potenti regimi antiretrovirali di combinazione determina nella maggioranza dei pazienti una pronta riduzione dei livelli plasmatici di HIV-RNA ed una progressiva e sostanziale ricostituzione del comparto dei linfociti T CD4 (*full-responders-FRs*).

Tuttavia, in una percentuale di individui variabile tra il 15% ed il 30% a seconda delle casistiche, si osserva una dissociazione della risposta viro-immunologica alla HAART [73].

Più in particolare, nell'ambito di queste risposte "discordanti" sono stati descritti due diversi scenari, uno caratterizzato dal progressivo recupero della conta di linfociti T CD4 a fronte di un mancato controllo dei livelli di replicazione virale (cosiddetti *virological non-responders - VNRs*), ed uno caratterizzato dalla normalizzazione della viremia plasmatica pur in presenza di una non congrua risposta in termini di recupero quantitativo del comparto CD4 (*immunological non responders- INRs*) [74]. Questi ultimi pazienti, a dispetto del controllo della viremia plasmatica, rimangono di fatto a rischio di sviluppare infezioni opportunistiche ed eventi clinici HIV-1 correlati [75].

Molteplici fattori sono stati singolarmente chiamati in causa e descritti come rilevanti nella genesi degli INR. In particolare, l'età avanzata, in virtù del fatto che è associata al declino della funzionalità timica, sembra influenzare il recupero immunitario, rendendolo più lento [76].

Il nadir dei CD4 è considerato un affidabile fattore predittivo del recupero immunitario durante la HAART: più bassi sono i valori di nadir ($CD4 < 200/mm^3$) maggiore è la probabilità che l'individuo sviluppi una risposta viro-immunologica discordante [77].

Polimorfismi in geni coinvolti nell'omeostasi T cellulare possono interferire con il recupero di CD4 durante la HAART. Recentemente è stata trovata una associazione significativa tra il recupero di CD4 e polimorfismi in geni codificanti per $TNF\alpha$ e IL15/IL15R. Allo stesso modo polimorfismi in recettori delle chemochine e dei geni HLA possono essere associati a risposte discordanti [78].

La riduzione della funzionalità timica sembra essere una delle ipotesi più plausibili in grado di spiegare il fallimento immunologico nella ricostituzione del comparto CD4. Diversi studi hanno infatti evidenziato una ridotta timopoiesi e ridotte dimensioni timiche nei soggetti INR, ad indicare una ipofunzionalità che si traduce anche in un'alterazione del *signalling* di IL-7, in un deficit della produzione della citochina e dell'espressione di IL-7R [79].

Recenti osservazioni sembrano supportare l'ipotesi secondo cui la mancata ricostituzione immunitaria potrebbe essere dovuta ad un persistente danneggiamento del midollo osseo, che comporterebbe un'alterazione della capacità clonogenica e delle funzioni delle cellule stromali [80].

Altri parametri immunologici come possibili responsabili di questo fallimento sono stati presi in considerazione. Tra questi, una persistente e accelerata apoptosi è stata indicata come una delle possibili cause della continua deplezione dei CD4 [81].

Di recente è stata descritta una significativa correlazione inversa tra la frequenza di cellule CD4 contenenti DNA provirale e il rapporto CD4/CD8 negli INR, suggerendo che la persistenza di replicazione virale a bassi livelli, pur in presenza di negativizzazione della carica virale plasmatica, possa in parte spiegare il fallito raggiungimento di una conta CD4 congrua [82].

E' stato proposto un ulteriore modello di iperattivazione, secondo cui il virus è responsabile di danni alla componente immunitaria della mucosa gastrointestinale. Ciò provoca mancanza di integrità nella barriera intestinale e conseguente passaggio in circolo di frammenti microbici responsabili della continua attivazione del sistema immunitario [83]. Si è perciò ipotizzato che la continua traslocazione, nonostante il trattamento con HAART, possa essere rilevante nell'ostacolare la ricostituzione dei CD4 nei pazienti INR [84].

Scopo dello Studio

L'infezione da HIV si caratterizza per una selettiva e progressiva deplezione delle cellule T CD4, a cui si associa un generalizzato stato di iperattivazione del sistema immunitario, solo in parte controllato dall'introduzione della terapia antiretrovirale ad alta efficacia (HAART) [11, 85-87].

Il fenomeno dell'iperattivazione immunitaria è stato dimostrato essere responsabile del mancato recupero numerico dei linfociti T CD4+ in corso di terapia [13]. Dati di letteratura hanno infatti dimostrato come fino al 30% dei soggetti sottoposti ad un primo regime HAART, pur presentando una carica virale negativa (cioè valori di HIV-RNA <40cp/ml), mostrino un inadeguato recupero della conta dei linfociti T CD4 [75, 88-91] (e pertanto definiti "Immunological Non-Responders", INR), con livelli di attivazione immune più alti rispetto a pazienti con un buon recupero immunologico (pazienti "Full Responders", FR) [13, 17, 76].

Sebbene le cause siano ancora da chiarire, molteplici sono i meccanismi che contribuiscono al mancato recupero dei CD4. Tra questi, sembrano essere coinvolti fattori quali l'età avanzata, le co-infezioni con virus epatitici, l'alterazione dell'omeostasi T-cellulare, così come il nadir dei CD4, la traslocazione microbica (TM) e la presenza di *reservoir* virali [92-95].

Un ruolo chiave nella patogenesi dell'immuno-attivazione in corso di infezione da HIV è sicuramente svolto dalla traslocazione microbica sia in soggetti naive in diverse fasi di infezione sia in soggetti in corso di HAART [18]. Marcatore per eccellenza di traslocazione microbica è il lipopolisaccaride (LPS), i cui livelli correlano con la progressione della malattia e diminuiscono dopo introduzione della HAART, senza tuttavia raggiungere i valori osservati nei soggetti HIV-negativi [18].

Dati di letteratura hanno dimostrato che in corso di infezione da HIV si assiste ad una drammatica alterazione della mucosa gastro-intestinale, con incremento dell'infiammazione locale, passaggio in circolo di prodotti di derivazione batterica e modificazioni della composizione della flora residente [16, 83, 96]. Più precisamente, è stata descritta una diminuzione della frequenza di microorganismi protettivi (bifidobatteri, lactobacilli) a favore di batteri potenzialmente più patogeni (*P. aeruginosa*, *C. albicans*) [96].

Le macromolecole microbiche, una volta in circolo, vengono riconosciute dai Toll-Like Receptors (TLR) presenti su cellule presentanti l'antigene (APC), come i monociti-macrofagi, e in seguito alla trasduzione del segnale portano alla produzione di citochine pro-

infiammatorie che attivano i linfociti T, perpetrando il danno [97-100]. Alterazioni a carico del sistema dei TLR sono state descritte in corso di infezione da HIV [4, 6, 20, 101-105].

Benché negli ultimissimi anni sia stato ampiamente dimostrato il peso della traslocazione microbica nel sostenere l'attivazione immune e in ultima analisi nell'ostacolare il recupero CD4 [95, 106], non si è ancora giunti ad una risposta definitiva che possa chiarire in modo esaustivo il ruolo dell'iperattivazione immune nella patogenesi alla base del mancato recupero T linfocitario, facendo quindi intuire che la traslocazione microbica sia un fattore importante ma non l'unico.

A tal proposito, un altro interessante meccanismo che potrebbe in parte spiegare il mantenersi dell'immuno-attivazione nonostante la terapia è la presenza dei *reservoir* virali [36, 107]. Il virus che si "nasconde" all'interno dei CD4 infettati in modo latente, è in grado di replicare a basso titolo sfruttando le modificazioni epigenetiche della cellula ospite e rendendo quindi la HAART incapace di eradicare l'infezione [48]. Proprio questo fenomeno è oggetto di grande interesse per i possibili vantaggi terapeutici che deriverebbero dall'impiego di agenti in grado di riattivare il virus, penetrando laddove la HAART non ha accesso.

Se e come la traslocazione microbica e la presenza di *reservoir* virali siano legati tra loro rimane ancora da indagare. Da un lato la persistenza di virus nell'organismo potrebbe sostenere il danno a carico della barriera intestinale, favorendo il passaggio in circolo di macromolecole di origine batterica, dall'altro la traslocazione microbica, rendendosi responsabile dell'attivazione delle cellule T, potrebbe favorire la replicazione virale, con conseguente infezione di nuove cellule e la persistenza di HIV al loro interno.

É indubbio che entrambi questi fenomeni sono ad oggi considerati dei bersagli terapeutici molto interessanti per lo sviluppo di strategie adiuvanti alla classica HAART.

Sulla base di queste premesse, ci siamo posti come scopo generale quello di studiare il ruolo delle macromolecole microbiche e dei *reservoir* virali nel mancato recupero T linfocitario in corso di terapia antiretrovirale.

Al fine di raggiungere tale compito, abbiamo stabilito i seguenti tre obiettivi principali:

1) studio della composizione della flora traslocante. I pazienti HIV-positivi che si presentano tardivamente alla diagnosi (*Advanced Naive*), hanno una maggiore probabilità di rispondere in modo non sufficiente alla terapia antiretrovirale [94]. Dato che nei pazienti con inadeguata

risposta alla HAART, sono stati dimostrati maggiori livelli circolanti di LPS nonostante la terapia in corso [95], abbiamo voluto indagare se la maggiore traslocazione microbica si accompagnasse ad uno squilibrio nella composizione della flora traslocante, possibilmente a svantaggio di specie meno patogene.

2) studio della stimolazione dei TLR. Il riconoscimento dei frammenti batterici da parte dei TLR determina un'attivazione delle cellule T [98, 99]. Visto che i soggetti HIV-positivi si caratterizzano per una maggiore immuno-attivazione [86], ci siamo chiesti se tale comportamento potesse riflettere un'alterata risposta del sistema dei TLR. Abbiamo quindi voluto approfondire il ruolo della stimolazione dei TLR nella genesi dell'attivazione T-linfocitaria e macrofagica in corso di storia naturale da HIV e in seguito a trattamento HAART. Abbiamo inoltre voluto indagare se la generalizzata attivazione cellulare conseguente alla stimolazione dei TLR avesse un qualche ruolo nella riattivazione virale.

3) studio dei *reservoir* virali. Alcuni dati di letteratura recenti sembrano suggerire un ruolo dei *reservoir* virali nel sostenere l'attivazione del sistema immunitario [108]. Tuttavia molto poco si sa sul ruolo di tali *reservoir* nell'immuno-ricostituzione. In modo interessante, è stato descritto che alcuni agenti, tra cui lo stesso LPS, sembrano essere in grado di riattivare il virus nelle cellule latentemente infette [109, 110]. Poichè in corso di HAART, FR e INR hanno differenti livelli di traslocazione microbica a cui si associa un diverso grado di attivazione, abbiamo ipotizzato che a diversi livelli di immuno-attivazione potrebbe corrispondere una diversa entità dei *reservoir* e una diversa capacità di riattivare il virus, abilità questa che potrebbe interessare anche la risposta ad altri agenti riattivanti.

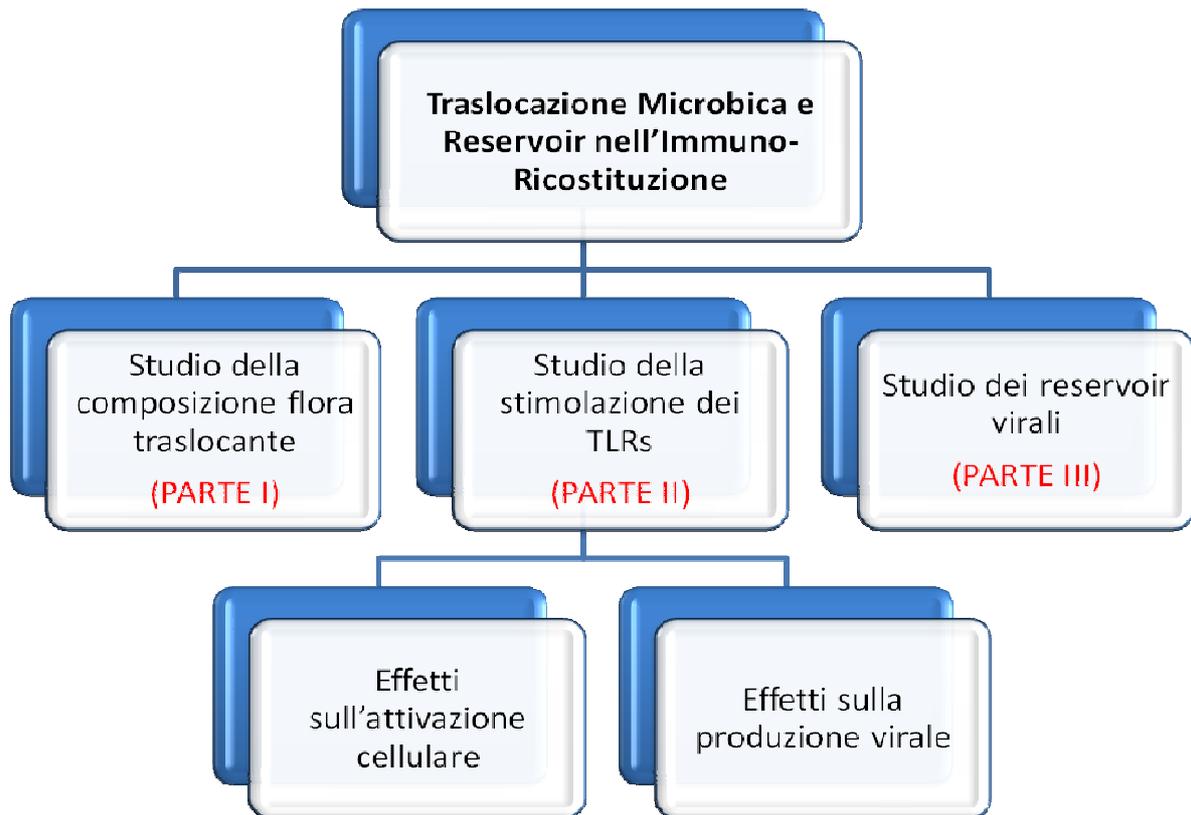


Figura 1. Schema sperimentale

PARTE I.

Studio della composizione della Flora Traslocante

MATERIALI E METODI

Reclutamento Pazienti.

44 pazienti HIV-positivi naive alla terapia antiretrovirale ad alta efficacia (HAART) con nadir $CD4 < 200/mm^3$ sono stati arruolati consecutivamente presso la Clinica di Malattie Infettive e Tropicali, Università di Milano, Ospedale San Paolo, Milano.

I pazienti sono stati seguiti prospetticamente per 12 mesi dall'introduzione della terapia, classificandoli sulla base della risposta viro-immunologica in:

1. *Partial Immune Responders* -PIR : $CD4 \geq 250/mm^3$ e HIV-RNA < 60 cp/mL in almeno 3 determinazioni consecutive
2. *Immunological Non Responders* -INR: $CD4 \leq 200/mm^3$ e HIV-RNA < 60 cp/mL in almeno 3 determinazioni consecutive

Criteri di esclusione dallo studio:

- ✓ inizio terapia durante infezione primaria
- ✓ segni o sintomi di patologie gastrointestinali e cirrosi

Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato, approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale.

Le diverse analisi di laboratorio sono state condotte al momento di inizio della terapia (T0) e dopo 12 mesi di HAART (T12).

Come gruppo di controllo sono, inoltre, stati arruolati 13 soggetti sani HIV-negativi.

Misurazione livelli plasmatici di LPS e sCD14.

La traslocazione microbica è stata valutata misurando i livelli plasmatici di Lipopolisaccaride, LPS (LAL test, Kinetic-QCL; Cambrex, Italia) e di CD14 solubile, sCD14 (ELISA; R&D System, Minneapolis, MN), in accordo con le istruzioni fornite dalle case costruttrici.

PCR 16S panbatterica.

Per rilevare la presenza di materiale genomico di origine batterica nel plasma dei pazienti in studio, il DNA estratto (DNA Easy Kit, Lifetech - Invitrogen, MB, Italia) è stato amplificato mediante PCR qualitativa per il gene ribosomale 16s, i cui primer, disegnati nella regione più conservata, permettono la rilevazione sia di Gram+, sia di Gram- [111]. Il DNA è stato amplificato in un volume di reazione di 100 μ L (10 μ L di 10x buffer, 5 μ L di 25 mM $MgCl_2$, 0.5 μ L di Taq Gold [Lifetech - Applied Biosystems, MB, Italia], 5 μ L di dNTPs 2 mM [Promega], 1 μ L RW01 50 μ M, 1 μ L DG74 50 μ M (ref) e 34 μ L di H_2O), alle seguenti

condizioni: 94°C per 5 min, 94°C per 1 min, 55°C per 1 min e 72°C per 1 min per 40 cicli, 10 min at 72°C. Il prodotto di circa 360bp è stato visualizzato su gel di agarosio 2%.

Per confermare l'integrità del DNA estratto, è stata eseguita una seconda PCR qualitativa per il gene di riferimento Beta-globina.

Clonaggio e sequenziamento.

Il prodotto della PCR panbatterica di 360 bp è stato clonato in cellule di E.coli (Topo® TA Cloning® Kit, with pCR®2.1-TOPO®, with One Shot TOP10 Chemically Competent E.coli. Invitrogen) e 10 colonie rappresentative sono state successivamente sequenziate (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer; Applied Biosystem, Inc., Abilene, Texas, USA), al fine di identificare le specie batteriche maggiormente rappresentate. Solo le sequenze per cui vi era un'omologia del 98-100% (BLAST) sono state considerate attendibili.

Analisi Statistiche.

Le variabili continue sono state presentate come mediane e range interquartile (IQR), mentre le variabili categoriche sono state rappresentate come numeri e percentuali. Il test Mann-Whitney con il metodo Montecarlo per piccoli campioni è stato usato per il confronto tra 2 gruppi, mentre il Kruskal-Wallis è stato usato per il confronto tra 3 gruppi. Le variabili categoriche sono state confrontate tramite test Chi-quadrato e test esatto di Fisher. I risultati delle analisi di sequenziamento sono state presentate come # di pazienti che mostrano uno specifico ordine, famiglia, specie di batteri/totale # di pazienti con risultato della PCR positivo. Per confrontare la percentuale di PCR positive vs PCR negative tra INR e PIR e tra i diversi tempi (T0 e T12) nello stesso gruppo di pazienti, abbiamo usato il test Chi-quadrato e il test esatto di Fisher. Un valore $p < 0.05$ è stato considerato significativo da un punto di vista statistico. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il software SPSS (versione 17.01).

RISULTATI

Caratteristiche dei pazienti in studio.

Abbiamo studiato prospetticamente 44 soggetti HIV-infetti che iniziavano un primo regime HAART con una grave deplezione di linfociti T CD4. Al momento dell'inizio della terapia i pazienti avevano una conta mediana di CD4 pari a 63/mmc (28-117) che aumentava fino a 281/mmc (180-357) ad un anno dall'introduzione della HAART.

A T12, 29 (67%) soggetti sono stati classificati come *Partial Immunological Responders* (PIR, HIV-RNA<60cp/mL; CD4 \geq 250/mmc) e 15 (33%) come *Immunological non Responders* (INR, HIV-RNA<60cp/mL; CD4<200/mmc).

Per quanto riguarda i parametri HIV correlati, al momento dell'arruolamento i PIR avevano nadir CD4 e zenith HIV-RNA più alti (p=.011; p=.034 rispettivamente; Tabella 1) rispetto agli INR. A T12, come definito dai criteri di inclusione, i PIR avevano una conta CD4 maggiore (p<.0001; Tabella 1). Se confrontati con gli HIV-negativi di controllo, i pazienti HIV-infetti sono risultati più anziani (p=.002; Tabella 1) e con una maggior proporzione di uomini (p=.001; Tabella 1).

I gruppi erano paragonabili per tutte le altre caratteristiche demografiche, cliniche e HIV correlate (Tabella 1).

I pazienti HIV-infetti che iniziano la HAART con una grave linfopenia mostrano livelli di traslocazione microbica persistentemente elevati.

Quando confrontati con gli HIV-negativi di controllo, i pazienti HIV-infetti mostrano più alti livelli di sCD14 sia a T0 che a T12 (HIV- 1,96 μ g/mL [1,9–2,3]; HIV+, T0 3,07 μ g/mL [2,7–4,1], HIV+, T12 4,26 μ g/mL [2,8–8,5]; p=.002, p=.001 rispettivamente), a conferma di una maggiore traslocazione microbica (Tabella 1).

Suddividendo i pazienti HIV+ sulla base della risposta immunologica alla HAART, abbiamo visto che PIR e INR avevano livelli simili di LPS (PIR, 75 pg/mL [52–82]; INR, 75 pg/mL [51–85]; p=.95; Tabella 1) e di sCD14 (PIR: 3,18 μ g/mL [2,7–4,5]; INR: 3,07 μ g/mL [2,8–3,9]; p=.73; Tabella 1), che non venivano modificati dopo 12 mesi di HAART (LPS: PIR 75 pg/mL [62–139], p=.2; INR 75pg/mL [65–114], p=.36; sCD14: PIR, 4,26 μ g/mL [2,5–8,5], p=.1, INR 3,85 μ g/mL (2,8–11,6) p=.5; Tabella 1).

I pazienti *Immunological Non Responders* mostrano una maggiore presenza in circolo di frammenti genomici di origine batterica.

L'osservazione di comparabili livelli circolanti di LPS nonostante un diverso recupero CD4 in seguito ad HAART è stato un dato inaspettato. Per tale motivo, abbiamo deciso di approfondire l'aspetto legato alla traslocazione microbica, valutando la presenza di materiale genomico di origine batterica all'interno del plasma. A T0, 14/44 (32%) HIV+ hanno dato un risultato positivo per l'amplificazione del gene rRNA 16S, con una maggior proporzione di positività nei soggetti INR (INR: 8/15, 53%; PIR: 6/29, 20%; $p=0.04$). La stessa tendenza è stata mantenuta al T12, dove dei 7/44 (16%) HIV+ risultati positivi, 4/15 (27%) appartenevano al gruppo INR e 3/29 (10%) al gruppo PIR ($p=0.21$). In modo interessante nessuno degli HIV- di controllo ha dato un risultato positivo per la PCR, confermando l'integrità della barriera gastro-intestinale.

I pazienti HIV-infetti che iniziano la HAART con una grave linfopenia si caratterizzano per una composizione polimicrobica della flora circolante.

I pazienti per i quali l'amplificazione aveva dato un risultato positivo, sono stati ulteriormente studiati, al fine di identificare le specie batteriche maggiormente rappresentate in circolo. Per ogni paziente sono state sequenziate 10 colonie batteriche rappresentative, per un totale di 140 colonie al T0 e 70 al T12, così suddivise: T0: 8 INR-->80 colonie e 6 PIR -->60 colonie; T12: 4 INR-->40 colonie e 3 PIR -->30 colonie.

Il sequenziamento delle colonie ha rivelato per ogni paziente una flora traslocante appartenente a diversi ordini batterici, senza alcuna variazione nella composizione tra T0 e T12 (Fig.1a).

In particolare, è rimasta costante la proporzione di batteri appartenenti all'ordine Enterobacteriales (T0: 13/14 [93%]; T12: 7/7 [100%] $p=0.75$), Lactobacillales (T0: 8/14 [57%]; T12: 5/7 [71%] $p=1$), Pseudomonadales (T0: 6/14 [43%]; T12: 4/7 [57%] $p=1$), Burkholderiales (T0: 8/14 [57%]; T12: 3/7 [43%] $p=0.74$) e Bacillales (T0: 3/14 [21%]; T12: 2/7 [29%] $p=1$) (Fig.1a).

Tuttavia, dividendo i pazienti HIV+ in PIR e INR, sono emerse differenze interessanti tra i due gruppi in studio.

Per quanto riguarda gli ordini batterici, al T0 PIR e INR mostravano una proporzione simile di Enterobacteriales (PIR: 5/6 [83%] vs INR: 8/8 [100%], $p=0.43$; Fig.1b-c), Lactobacillales (PIR: 4/6 [67%] vs INR: 4/8 [50%]; $p=0.63$; Fig.1b-c), Burkholderiales (PIR: 2/6 [17%] vs INR: 6/8 [75%]; $p=0.28$; Fig.1b-c) e Bacillales (PIR: 2/6 [17%] vs INR: 1/8 [12%]; $p=0.54$; Fig.1b-c). In modo interessante, una maggior proporzione di PIR presentava batteri

appartenenti all'ordine Pseudomonadales (5/6 [83%] vs 1/8 [12%]; $p=.026$; Fig.1b-c). Nessun cambiamento significativo nella composizione batterica dopo introduzione della terapia è stato riscontrato nei due gruppi in studio (Fig.1b-c).

Dopo aver identificato gli ordini batterici, abbiamo studiato più in dettaglio le diverse famiglie (Fig.2) e generi batterici (Fig.3).

Confrontati con gli INR, al T0 i PIR mostravano una maggior proporzione di Lactobacillaceae (0/8 [0%] vs 3/6 [50%]; $p=.05$; Fig.2a-b) e Pseudomonadaceae (1/8 [13%] vs 5/6 [83%]; $p=.026$; Fig.2a-b). In particolare, le differenze riguardavano *Lactobacillus* sp (PIR 3/6 [50%] vs INR 0/8 [0%]; $p=.05$; Fig.3a-b) e *Pseudomonas* sp (PIR 5/6 [83%] vs INR 1/8 [13%]; $p=.026$; Fig.3a-b). Dopo 12 mesi di HAART, entrambi i gruppi in studio non mostrano significative variazioni nella composizione della flora traslocante in termini di famiglie (Fig.2a-b) e generi batterici (Fig.3a-b).

DISCUSSIONE

È stato ampiamente descritto che i livelli plasmatici di LPS/sCD14 diminuiscono dopo terapia [18, 95, 112] e correlano inversamente con l'entità del recupero dei CD4 [113]. Tuttavia, mentre i pazienti che iniziano la HAART con alti CD4 hanno una riduzione dei livelli di LPS/sCD14, quelli invece che iniziano la HAART con conte CD4 più basse faticano a controllare la traslocazione microbica [95]. In accordo con queste osservazioni, nel nostro lavoro abbiamo osservato che chi iniziava la terapia con bassi CD4 comunque manteneva livelli elevati di traslocazione microbica anche a 12 mesi dall'introduzione della HAART.

Una possibile spiegazione del mancato controllo della traslocazione microbica in questo gruppo di pazienti sembrerebbe riguardare il drammatico danno strutturale della barriera intestinale descritto in corso di infezione avanzata di HIV/SIV [16, 83]. Il danno del tratto GI e la conseguente traslocazione microbica sembrano essere difficilmente riparati da una tardiva introduzione della terapia.

L'aspetto più intrigante di questa prima parte dello studio è l'osservazione per cui i pazienti HIV-positivi che iniziano la terapia con una grave deplezione dei CD4 mostravano una flora batterica circolante polimicrobica, non modificata dalla terapia. In modo interessante, nonostante comparabili livelli di LPS, abbiamo osservato alcune differenze nella composizione della flora in accordo al grado di immuno-ricostituzione. In particolare, nei pazienti INR abbiamo trovato una maggior prevalenza di *Enterobacteriaceae* potenzialmente più patogene e nessuna evidenza di *Lactobacillus* che al contrario è stato dimostrato avere proprietà immunomodulatorie [114]. Questo squilibrio potrebbe risultare in un maggior stimolo antigenico, esacerbando la generale iperattivazione.

Sebbene questo studio non sia stato disegnato per identificare associazioni significative tra genotipo della flora traslocante e *outcome* immunologico, queste osservazioni indicano una potenziale correlazione tra specie batteriche traslocanti e immuno-ricostituzione in corso di infezione da HIV. La nostra ricerca potrebbe rappresentare un punto di partenza per nuove ipotesi da testare in studi più ampi volti ad investigare il ruolo dei batteri traslocanti nella regolazione dell'omeostasi dell'immunità sistemica e mucosale.

PARTE II.

Studio della stimolazione dei *Toll- like Receptors* (TLR)

MATERIALI E METODI

Reclutamento Pazienti.

58 pazienti HIV-positivi sono stati arruolati consecutivamente presso la Clinica di Malattie Infettive e Tropicali, Università di Milano, Ospedale San Paolo, Milano.

Di questi pazienti, 23 soggetti (NA) erano naive per la terapia antiretrovirale e 35 (HT) erano in HAART stabile da almeno 12 mesi, con carica virale soppressa (HIV-RNA<40cp/mL) in almeno tre determinazioni consecutive e con un nadir CD4 \leq 350/mmc.

Criteri di esclusione dallo studio:

- ✓ profilassi antibiotica al momento dell'arruolamento
- ✓ segni e/o sintomi di patologie gastrointestinali e cirrosi

I pazienti NA sono stati suddivisi in:

1. *High CD4 count* (HC): CD4 \geq 500/mmc
2. *Low CD4 Count* (LC): CD4<500/mmc.

I pazienti HT sono stati suddivisi in 2 gruppi, in accordo con il grado di immunoricostruzione in corso di HAART:

1. *Full Responders* (FR): CD4 \geq 350/mmc
2. *Immunological Non Responders* (INR): CD4<350/mmc

Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato, approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale.

Come gruppo di controllo sono stati arruolati 13 soggetti sani HIV-negativi.

Isolamento e coltura di monociti primari.

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state isolate da sangue intero mediante metodica Ficoll (Biocoll, Biospa, Milano, Italia). I monociti sono stati separati dai linfociti, sfruttando la capacità di adesione sul fondo della piastra. Dopo 48h di incubazione, le cellule non adese sono state eliminate grazie a due lavaggi consecutivi con RPMI caldo. La purezza della coltura monocitica/macrofagica (>90%) è stata determinata dall'analisi citofluorimetrica con CD14-FITC (BD Pharmigen, San Diego, CA). I monociti sono stati fatti differenziare in macrofagi (MDM) mettendoli in coltura con terreno R10 (RPMI, 10% siero bovino fetale (FBS), L-glutammina 2 mM, penicillina 100U/ml, streptomina 100 μ g/ml) per 15 giorni. Gli MDM sono stati lavati con phosphate-buffered saline (PBS) e il terreno di coltura è stato sostituito ogni 2 giorni.

Stimolazione di PBMC e MDM.

Le PBMC sono state piastrate ad una densità di 4×10^6 cell/pozzetto e stimolate per 24h con Lipolisaccaride -LPS- ($50 \mu\text{g/mL}$), Peptidoglicano -PGN- ($10 \mu\text{g/mL}$), Acido Lipoteicoico -LTA- ($1 \mu\text{g/mL}$), ssRNA40 ($6,25 \mu\text{g/mL}$) (InvivoGen, San Diego, CA), Interferon γ -IFN γ - (100U/mL), antiCD28 ($1,25 \mu\text{g/mL}$) (R&D System, Minneapolis, MN) e antiCD3 ($2,5 \mu\text{g/mL}$) (BD Pharmigen, San Diego, CA). Dopo 24h, i surnatanti sono stati raccolti e conservati per successivi saggi ELISA. Le cellule sono state raccolte per analisi di citofluorimetria.

Al termine dei 15 giorni di coltura, gli MDM (5×10^5 cells/well) sono stati stimolati con LPS ($50 \mu\text{g/mL}$), PGN ($10 \mu\text{g/mL}$), LTA ($1 \mu\text{g/mL}$), ssRNA40 ($6,25 \mu\text{g/mL}$) e IFN γ (100U/mL). Dopo 24h, i surnatanti sono stati raccolti e conservati per successivi saggi ELISA. Gli MDM, staccati gentilmente dal fondo della piastra utilizzando uno *scraper* di plastica in presenza di PBS freddo, sono stati successivamente analizzati al citofluorimetro.

Citofluorimetria.

L'espressione delle molecole di superficie è stata valutata attraverso citofluorimetria su PBMC e MDM, utilizzando i seguenti anticorpi fluorocromati: CD4-PECy7, CD8-PECy5, CD14-PECy7, CD69-PECy5, CD45-PE, (Instrumentation Laboratory, Milano, Italia), HLA-DR-FITC, CD38-PE, CD4-PE, CD8-PerCPCy5.5, Ki67-FITC (BD Bioscience, San Diego, CA). Abbiamo misurato l'attivazione (HLA-DR e CD38), l'apoptosi (Annessina V) e la proliferazione (Ki67) su linfociti T CD4 e CD8. Sugli MDM abbiamo misurato l'attivazione (CD69) e la funzionalità (HLA-DR).

Sono state usate le seguenti combinazioni: CD8/CD4/CD38/HLA-DR, CD4/AnnexV/7AAD, CD8/AnnexV/7AAD, CD8/CD4/Ki67 and CD45/CD14/CD69/HLA-DR.

Brevemente, le cellule sono state marcate per 20 min al buio a 4°C , successivamente sono state lavate con PBS, fissate con formaldeide 2% e analizzate usando FC500 (Beckman Coulter, Hialeah, FL). Un passaggio aggiuntivo di permeabilizzazione si è reso necessario per la marcatura intracellulare dell'antigene nucleare Ki67. Il software CXP è stato usato per le analisi. Le PBMC sono state identificate dapprima sulla base delle proprietà morfologiche, poi come CD4 e/o CD8 positive e alla fine come CD38+/HLA-DR+ o Annessina V+/7AAD+ o Ki67+. Gli MDM sono stati identificati dapprima sulla base delle proprietà morfologiche insieme all'espressione del CD45, poi come CD14+ e alla fine come CD69+/HLA-DR+.

Saggio ELISA per la rilevazione dell'antigene p24 di HIV.

I surnatanti ottenuti dalle colture di PBMC e di MDM di pazienti HIV-infetti sono stati raccolti dopo 24h di stimolazione per la misura dell'antigene p24. La quantificazione è stata eseguita su campioni congelati tramite saggio ELISA in accordo con il foglietto illustrativo (R&D System, Minneapolis, MN).

Misurazione livelli di LPS e sCD14.

I livelli plasmatici di LPS sono stati misurati tramite test LAL (Kinetic-QCL; Cambrex, Italia), mentre i livelli di sCD14 nel surnatante delle colture cellulari sono stati misurati tramite saggio ELISA (R&D System, Minneapolis, MN).

Analisi statistiche.

Le variabili continue sono state presentate come mediane e range interquartili (25°-75° percentile), mentre i dati categorici sono stati rappresentati come numeri assoluti e percentuali. Il Mann Whitney U test, il test di Wilcoxon e il Chi-quadrato sono stati utilizzati per le analisi tra 2 gruppi. Il Kruskal-Wallis è stato usato per il confronto tra HIV-/HC/LC e HIV-/FR/INR. I parametri per i quali il valore p è risultato minore di 0.05 con il Kruskal-Wallis sono stati ulteriormente analizzati con il Mann-Whitney. Un valore $p < 0.05$ è stato considerato significativo. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism 5.

RISULTATI

Caratteristiche dei pazienti in studio.

Dei 23 pazienti HIV-positivi naive per la terapia antiretrovirale, 11 soggetti sono risultati essere HC ($CD4 \geq 500/mm^3$) e 12 LC ($CD4 < 500/mm^3$). La durata dell'infezione era comparabile tra i due gruppi (HC 2 anni, [2-4]; LC 2 anni, [2-4,5]; $p=.978$; Tabella 2). Come da criteri di inclusione, HC avevano una conta significativamente più alta ($587/mm^3$, [552-651] vs $403/mm^3$ [301-447]; $p < 0.0001$; Tabella 2). Nessun'altra differenza nei parametri demografici, clinici e HIV correlati è stata riscontrata (Tabella 2).

Sulla base del grado di immuno-ricostituzione durante la terapia, i 35 soggetti arruolati sono stati divisi in 20 FR ($CD4 \geq 350/mm^3$) e 15 INR ($CD4 < 350/mm^3$). La durata dell'infezione di HIV era simile tra i due gruppi (Tabella 3). Tutti i pazienti avevano introdotto la terapia antiretrovirale da almeno 12 mesi, senza alcuna differenza nella durata della HAART (FR 4,5 anni [3-5]; INR 5 anni [3-6]; $p=.444$; Tabella 3) e nel tipo di regime terapeutico (Tabella 3). FR e INR sono risultati paragonabili per nadir CD4 (FR $97/mm^3$ [42-230]; INR $94/mm^3$ [26-124]; $p=.342$; (Tabella 3), ma non per conta CD4, come definito dai criteri di inclusione (FR $451/mm^3$ [404-585] vs INR $237/mm^3$ [164-299]; $p < 0.0001$; Tabella 3). I pazienti con un minor recupero immunologico erano quelli con un maggior numero di diagnosi di AIDS (FR 5/20 [25%] vs INR 9/15 [60%]; $p=.079$; tabella 3).

Nessun'altra differenza nei parametri demografici, clinici e HIV correlati è stata riscontrata (Tabella 3.)

Nei soggetti naive alla terapia antiretrovirale la stimolazione dei TLR si traduce in un debole effetto sull'attivazione e sulla produzione virale.

Le tabelle 4 e 5 riassumono gli effetti della stimolazione dei TLR sull'attivazione, proliferazione ed apoptosi T-cellulare nei soggetti naive alla terapia HAART.

Sebbene la stimolazione dei TLR non risulti in alcun aumento dell'attivazione intesa come HLA-DR+CD4 nei soggetti LC, HC e HIV- (Tabella 4), differenze significative nell'espressione di HLA-DR+ CD4 sono state osservate confrontando i tre gruppi tra di loro (UNST $p=.003$; LPS $p=.002$; LTA $p=.006$; PGN $p=.070$; ssRNA $p=.023$; $IFN\gamma$ $p=.009$; CD3/CD28 $p=.225$; Tabella 4). In particolare, gli LC si sono caratterizzati per una maggiore attivazione rispetto agli HC (UNST $p=.002$; LPS $p=.005$; LTA $p=.005$; PGN $p=.030$; ssRNA $p=.035$; $IFN\gamma$ $p=.010$; CD3/CD28 $p=.048$) e agli HIV- (UNST $p=.013$; LPS $p=.002$; LTA $p=.013$; PGN $p=.088$; ssRNA $p=.014$; $IFN\gamma$ $p=.007$; CD3/CD28 $p=.710$), mentre nessuna differenza è stata osservata tra HC e HIV-.

L'espressione di HLA-DR sui CD8 sembra invece risentire della stimolazione con LPS ($p=.007$; Tabella 4) e LTA ($p=.019$; Tabella 4) solo nel gruppo di controllo, mentre non vi erano differenze negli altri due gruppi in studio, ad eccezione degli HC che rispondevano alla stimolazione con PGN ($p=.042$; Tabella 4) e degli LC che rispondevano allo stimolo ssRNA ($p=.036$; Tabella 4).

Valutando l'attivazione solo come espressione di CD38, non abbiamo osservato grandi differenze tra i gruppi per quanto riguarda il subset CD4, sebbene ci sia stato un aumento di attivazione nel gruppo di controllo dopo stimolazione con LTA ($p=.054$; Tabella 4) e CD3/CD28 ($p=.031$; Tabella 4) e nel gruppo degli LC dopo stimolazione con ssRNA ($p=.031$; Tabella 4).

Le maggiori differenze riguardavano invece il subset CD8, in cui gli HC mostravano un aumento dell'attivazione T-cellulare dopo stimolazione con LTA ($p=.024$; Tabella 4), PGN ($p=.027$; Tabella 4) e ssRNA ($p=.016$; Tabella 4), mentre gli LC aumentavano l'attivazione solo dopo stimolazione con CD3/CD28 ($p=.047$; Tabella 4). In modo interessante, confrontando i 3 gruppi in studio abbiamo osservato che il gruppo di controllo si caratterizzava per livelli di attivazione significativamente più bassi quando confrontato con HC (UNST $p=.042$; LPS $p=.006$; LTA $p=.005$; PGN $p=.005$; ssRNA $p=.053$; IFN γ $p=.018$; CD3/CD28 $p=.267$) e LC (UNST $p=.042$; LPS $p=.010$; LTA $p=.042$; PGN $p=.007$; ssRNA $p=.032$; IFN γ $p=.018$; CD3/CD28 $p=.001$).

La stimolazione dei TLR non sembrava avere alcun effetto sulla proliferazione e sull'apoptosi delle cellule T dei pazienti in studio (Tabella 5).

A conferma di quanto osservato per le cellule T, anche per i macrofagi la stimolazione dei TLR non si è tradotta in grandi cambiamenti dell'espressione del marcatore di funzionalità HLA-DR e del marcatore di attivazione CD69.

I soggetti HIV- mostravano livelli di espressione di HLA-DR più alti rispetto a HC ed LC, senza però risultare significativi da un punto di vista statistico (UNST: HIV- 96,1% [93,1-97,3] vs HC 93,7% [91,6-96,1] vs LC 94,5% [90,7-95,8] $p=.187$; LPS: HIV- 96,9% [96-98,2] vs HC 94,8% [89-95,9] vs LC 94,7% [93,4-97,3] $p=.054$; LTA: HIV- 95,3% [93,3-97,7] vs HC 94,4% [91,8-95,6] vs LC 91,8% [91,1-96,8] $p=.323$; PGN: HIV- 95,7% [93,6-98,1] vs HC 94,8% [93,6-95,8] vs LC 92,9% [87,4-96,1] $p=.294$; ssRNA: HIV- 96,4% [92,7-97,8] vs HC 92,9% [90,6-94,1] vs LC 91,9% [86,8-93,9] $p=.082$; IFN γ : HIV- 96,1% [95,6-98,2] vs HC 94,7% [93,4-97,4] vs LC 95% [90,2-96,3] $p=.230$; Fig.4a).

L'espressione di HLA-DR non è stata modificata dopo stimolazione, nè nel gruppo degli HIV- (UNST vs LPS $p=.020$; vs LTA $p=.742$; vs PGN $p=1$; vs ssRNA $p=.204$; vs IFN γ $p=.219$;

Fig.4a) nè in quello degli HC (UNST vs LPS $p=.831$; vs LTA $p=.898$; vs PGN $p=.206$; vs ssRNA $p=.687$; vs IFN γ $p=.375$; Fig.4a) e degli LC (UNST vs LPS $p=.240$; vs LTA $p=.966$; vs PGN $p=.922$; vs ssRNA $p=.687$; vs IFN γ $p=.688$; Fig.4a).

Analogamente, nessuna differenza nell'espressione di CD69 è stata osservata tra i gruppi (UNST: HIV- 1,9% [1,4-4,2] vs HC 4,2% [2,8-5,3] vs LC 2,9% [1,5-3,7] $p=.135$; LPS: HIV- 2,3% [1,4-3,9] vs HC 4,1% [2,8-7,5] vs LC 3,2% [2,3-4,5] $p=.112$; LTA: HIV- 3,7% [2,9-4,3] vs HC 4,5% [2-7,7] vs LC 4,1% [2,8-4,7] $p=.828$; PGN: HIV- 3,2% [2,4-5,5] vs HC 3,6% [1,9-8,3] vs LC 3,9% [2,9-5,4] $p=.751$; ssRNA: HIV- 3,1% [1,5-8,6] vs HC 3,2% [1,5-4] vs LC 3,2% [2,9-5,6] $p=.729$; IFN γ : HIV- 3,1% [1,5-8,6] vs HC 6,2% [5,3-8,8] vs LC 5,3% [4,1-8,1] $p=.067$; Fig.4b).

Come ultimo passaggio, abbiamo deciso di indagare l'eventuale impatto esercitato dalla stimolazione dei TLR sulla produzione virale.

Sebbene HC e LC avessero una paragonabile produzione di p24 da parte dei PBMC (UNST: HC 1,40 pg/mL [0,58-14,22] vs LC 1,85 pg/mL [0,44-4,04]; $p=.751$; LPS: HC 1,18 pg/mL [0,26-8,08] vs LC 2,41 pg/mL [1,14-5,17] $p=.442$; ssRNA: HC 2,67 pg/mL [2,01-6,53] vs LC 3,19 pg/mL [1,42-7,98] $p=1$; ssRNA: 3,46 pg/mL [0,84-7,35] vs LC 3,72 pg/mL [1,04-4,71] $p=1$; Fig.5a), solo nel gruppo HC si è registrato un aumento della produzione virale dopo stimolazione con ssRNA ($p=.031$; Fig.5a).

Infine, nessuna differenza nella produzione di p24 da parte degli MDM è stata osservata nei due gruppi (HC: UNST 0,91 pg/mL [0-3,04] vs LPS 2,12 pg/mL [0,65-2,37] $p=.250$; vs ssRNA 1,51 pg/mL [0,72-1,75] $p=.875$; LC: UNST 1,25 pg/mL [0,24-2,23] vs LPS 1,34 pg/mL [0,45-2,31] $p=.799$; vs ssRNA 1,11 pg/mL [0,59-2,23] $p=.438$; Fig.5b).

La stimolazione dei TLR determina una diversa attivazione T-cellulare in accordo al grado di immuno-ricostituzione in corso di HAART.

FR e INR hanno mostrato livelli simili di HLA-DR+CD4 dopo stimolazione dei TLR (FR: UNST 21,8% [11,7-33,5] vs LPS 22,3% [13,4-38,1] $p=.615$, vs LTA 25,4% [15,5-39,3] $p=.153$, vs PGN 24,3% [14,6-44,3] $p=.632$, vs ssRNA 25,6% [12,9-46,4] $p=.482$, vs IFN γ 28,8% [20,6-38,5] $p=.127$; INR: UNST 20,8% [14,9-41,1] vs LPS 28% [14-35,4] $p=.737$, vs LTA 27,4% [14,3-33,7] $p=.887$, vs PGN 27,6% [16,7-34,3] $p=.478$, vs ssRNA 27,2% [16,7-46,43] $p=.289$, vs IFN γ 24,6% [16,6-39,2] $p=.740$; Fig.6a-b). Solo CD3/CD28 sembra essere in grado di aumentare HLA-DR+CD4 nei FR (65,8% [55,2-87] $p=.0002$; Fig.6b) e negli INR (70,9% [62,2-86,5] $p=.0003$; Fig.6b). Di conseguenza, confrontando i due gruppi con gli

HIV- di controllo non abbiamo osservato nessuna differenza (UNST $p=.489$; LPS $p=.612$; LTA $p=.565$; PGN $p=.672$; ssRNA $p=.872$; IFN γ $p=.818$; CD3/CD28 $p=.148$; Fig.6a-b).

Mentre nei FR abbiamo osservato un aumento di HLA-DR+CD8 dopo stimolazione con LPS (28,7% [20,2-58,3] vs 36,7% [24,3-55,6] $p=.009$; Fig.6c), LTA (39,3% [23,3-59,4] $p=.007$; Fig.6c), PGN (33,5% [22,4-51,6] $p=.037$; Fig.6c) e CD3/CD28 (70,6% [57,6-85,6] $p=.0001$; Fig.6d), negli INR c'è stato un aumento dell'attivazione solo dopo l'esposizione a CD3/CD28 (UNST 23,5% [14,4-33,2] vs LPS 36,8% [24,2-55,6] $p=1$; vs LTA 22,2% [12-38,8] $p=.868$; vs PGN 21,1% [12,4-39,4] $p=.849$; vs ssRNA 31,7% [13,8-49,9] $p=.266$; vs IFN γ 21,3% [17,1-38,9] $p=.507$; vs CD3/CD28 74,4% [52,6-80,7] $p=.0004$; Fig.6c-d).

Dal confronto tra FR, INR e HIV- sono emerse differenze significative solo dopo stimolazione con LPS, LTA e IFN γ (UNST $p=.137$; LPS $p=.027$; LTA $p=.028$; PGN $p=.137$; ssRNA $p=.069$; IFN γ $p=.025$; CD3/CD28 $p=.694$; Fig.6c-d). In tutti i casi gli INR mostravano minore HLA-DR+CD8 rispetto ai FR (LPS: $p=.029$; LTA: $p=.023$; IFN γ : $p=.081$) e agli HIV- (LPS: $p=.019$; LTA: $p=.03$; IFN γ : $p=.013$).

L'espressione del solo CD38 sui linfociti T CD4 è aumentata nel gruppo dei FR dopo esposizione a CD3/CD28 (UNST 45,5% [35,3-56,5] vs LPS 44,8% [23,2-54,5] $p=.573$; vs LTA 40,8% [27,8-54,7] $p=.259$; vs PGN 43,1% [31,6-57,1] $p=.276$; vs ssRNA 46,2% [36,4-62,5] $p=.205$; vs IFN γ 40,3% [32,4-55,2] $p=.218$; vs CD3/CD28 48,3% [39,2-48,3] $p=.035$; Fig.7a-b), mentre nel gruppo degli INR solo dopo esposizione a ssRNA (UNST 26% [18,1-50,7] vs LPS 26,3% [14,7-56,6] $p=.687$; vs LTA 26,9% [17,7-51,7] $p=.776$; vs PGN 24,4% [17,3-51,9] $p=.981$; vs ssRNA 28,9 % [22,4-67,9] $p=.018$; vs IFN γ 26,3% [17,8-58,9] $p=.603$; vs CD3/CD28 34,7% [25,8-64,9] $p=.014$; Fig.7a-b). Nessuna differenza tra i 3 gruppi in studio è stata riscontrata (UNST $p=.108$; LPS $p=.087$; LTA $p=.056$; PGN $p=.146$; ssRNA $p=.312$; CD3/CD28 $p=.070$; Figure 7a-b) ad eccezione della stimolazione con IFN γ ($p=.046$; Fig.7a-b), per la quale gli HIV- hanno mostrato valori maggiori quando confrontati con FR ($p=.021$) e INR ($p=.075$) (Fig.5a-b).

Per quanto concerne l'espressione di CD38 nel subset CD8, abbiamo osservato differenze significative nel gruppo dei FR dopo stimolazione con ssRNA e CD3/CD28 (UNST 26,2% [12,1-42,3]; LPS 28,5% [13,2-40,1] $p=.219$; LTA 25,9% [13,5-35,1] $p=.389$; PGN 28,2% [13,9-41,9] $p=.705$; ssRNA 51,1% [21,8-92,9] $p=.0006$; IFN γ 23,6% [13,5-45,8] $p=.360$; CD3/CD28 43,4% [25,6-61,2] $p=.0005$, Fig.7c-d). In modo interessante, il gruppo degli INR ha mostrato un aumento dell'attivazione dopo esposizione a pressoché tutti gli stimoli (UNST 16,7% [8,3-33,5]; LPS 24,4% [12-43,9] $p=.0008$; LTA 22,3% [9,9-39,7]

p=.009; PGN 15,1% [10-43,10] p=.037; ssRNA 34,5% [18,9-64,6] p=.0003; IFN γ 20,8% [10-41,7] p=.042; CD3/CD28 46,9% [21,9-55,9] p=.0004; Fig.7c-d).

Tuttavia, non abbiamo riscontrato alcuna differenza in CD38+CD8 confrontando HIV-, FR e INR (UNST, p=.437; LPS p=.649; LTA p=.709; PGN p=.628; ssRNA p=.739; IFN γ p=.825; CD3/CD28 p=.922; Fig.7c-d).

La stimolazione dei TLR non ha portato sostanziali cambiamenti nella proliferazione e apoptosi delle cellule T CD4 e CD8 dei pazienti FR e INR (Tabella 6).

La stimolazione virale, ma non quella batterica, determina una maggiore attivazione degli MDM in pazienti in corso di HAART con un diverso recupero immunitario.

I soggetti HIV- hanno mostrato livelli di espressione di HLA-DR più alti rispetto a quelli dei FR e INR, risultando significativi solo dopo stimolazione con LPS e ssRNA (UNST: HIV- 96,1% [93,1-97,3] vs FR 93,4% [45,7-96,9] vs INR 94,3% [66,7-95,9] p=.172; LPS: HIV- 96,9% [96-98,2] vs FR 92,1% [77,1-98,1] vs INR 89,5% [67,6-94,7] p=.016; LTA: HIV- 95,3% [93,3-97,7] vs FR 90% [75,5-97,3] vs INR 83,6% [75,7-96,2] p=.178; PGN: HIV- 95,7% [93,6-98,1] vs FR 92,9% [82,9-95,7] vs INR 90,3% [71,6-95,4] p=.108; ssRNA: HIV- 96,4% [92,7-97,8] vs FR 89,7% [83,6-97,3] vs INR 80,6% [41,8-88,8] p=.018; IFN γ : HIV- 96,1% [95,6-98,2] vs FR 93,6% [85,5-95,6] vs INR 82,5% [71,7-97,4] p=.070; Fig.8a).

Focalizzandoci, però, sull'espressione di HLA-DR all'interno di uno stesso gruppo, non abbiamo osservato alcuna variazione dopo stimolazione dei TLR nè nel gruppo dei FR (UNST vs LPS p=.944; vs LTA p=.575; vs PGN p=.463; vs ssRNA p=1; vs IFN γ p=.219; Fig.8a) nè in quello degli INR (UNST vs LPS p=.313; vs LTA p=.438; vs PGN p=.757; vs ssRNA p=1; vs IFN γ p=.250; Fig.8a).

Concentrandoci invece sull'attivazione degli MDM, non ci sono state differenze in CD69+CD14 confrontando tra loro HIV-, FR e INR (UNST: HIV- 1,9% [1,4-4,2] vs FR 1,7% [1,2-2,7] vs INR 1,6% [0,5-2,4] p=.211; LPS: HIV- 2,3% [1,4-3,9] vs FR 1,6% [1,2-3,4] vs INR 1,4% [0,5-3] p=.291; LTA: HIV- 3,7% [2,9-4,3] vs FR 2,5% [1,1-4] vs INR 1,3% [0,9-3,7] p=.249; PGN: HIV- 3,2% [2,4-5,5] vs FR 3,5% [2,2-5,2] vs INR 3,4% [1,3-5,6] p=.435; ssRNA: HIV- 3,1% [1,5-8,6] vs FR 2,6% [1,6-6,5] vs INR 3,8% [1,5-6,2] p=.972; IFN γ : HIV- 3,1% [1,5-8,6] vs FR 3% [1,5-4,2] vs INR 2,4% [0,6-5,4] p=.841; Fig.8b).

In modo interessante, solo lo stimolo ssRNA è stato in grado di aumentare l'espressione di CD69 sugli MDM nei FR (UNST vs LPS p=.184; vs LTA p=.079; vs PGN p=.156; vs ssRNA p=.002; vs IFN γ p=.094; Fig.8b) e negli INR (UNST vs LPS p=1; vs LTA p=.844; vs PGN p=.109; vs ssRNA p=.023; vs IFN γ p=.625; Fig.8b).

Sulla base di queste osservazioni, abbiamo deciso di studiare l'attivazione macrofagica anche misurando il rilascio di sCD14 direttamente dagli MDM stimolati e dalle PBMC totali. Differenze interessanti sono emerse stimolando la coltura di MDM. Il solo stimolo virale è stato in grado di aumentare la produzione di sCD14 nei FR (UNST 0,95 ng/mL [0,31-1,41] vs LPS 1,03 ng/mL [0,12-2,07], $p=.463$; ssRNA 1,91 ng/mL [1,38-4,84], $p=.0001$; Fig.9a) e negli INR (UNST 0,58 ng/mL [0,28-0,99] vs LPS 0,81 ng/mL [0,12-2,07], $p=.193$; ssRNA 1,98 ng/mL [0,95-3,75], $p=.009$; Fig.9a), senza differenze tra i due gruppi (UNST: $p=.429$; LPS: $p=.501$; ssRNA: $p=.661$; Fig.9a).

Al contrario, la produzione di sCD14 da parte dei PBMC non sembrava risentire della stimolazione dei TLR nè nel gruppo dei FR (UNST 52,3 ng/mL [23,9-69,8] vs LPS 52,7 ng/mL [34,1-73,7], $p=.067$; ssRNA 39,9 ng/mL [25,8-67,8], $p=.583$; Fig.9b), nè in quello degli INR (UNST 60,5 ng/mL [37,5-85,4] vs LPS 64,03 ng/mL [44,4-91,4], $p=.276$; ssRNA 91,6 ng/mL [34-109], $p=.177$; Fig.9b). Tuttavia, confrontando i gruppi è emerso che dopo stimolazione con ssRNA gli INR avevano livelli significativamente più alti (UNST: $p=.283$; LPS: $p=.171$; ssRNA: $p=.009$; Fig.9b).

La stimolazione dei TLR aumenta il rilascio/produzione di p24 nei pazienti con una risposta viro-immunologica completa alla HAART.

Nonostante i FR mostrassero una produzione spontanea di p24 da parte dei PBMC minore rispetto agli INR (0,62 pg/mL [0,08-17,24] vs 1,65 pg/mL [0,71-33,04]; $p=.084$; Fig.9c), non abbiamo riscontrato altre differenze confrontando i due gruppi (LPS: FR 0,79 pg/mL [0,23-32,95] vs INR 1 pg/mL [0,60-26,78] $p= 537$; ssRNA: FR 2,58 pg/mL [1,27-28,60] vs INR 5,60 pg/mL [1,46-96,73] $p= 326$; CD3/CD28: FR 1,06 pg/mL [0,33-33,16] vs INR 1,87 pg/mL [1,29-33,47] $p= 149$; Fig.9c).

In modo interessante, mentre nei FR la produzione di p24 è aumentata dopo stimolazione dei TLR (LPS $p=.061$; ssRNA $p=.028$; CD3/CD28 $p=.012$; Fig.9c), negli INR solo l'esposizione a ssRNA si è tradotta in un incremento di p24 (LPS $p=.256$; ssRNA $p=.0015$; CD3/CD28 $p=.567$; Fig.9c).

In accordo con questi dati, la stimolazione degli MDM con LPS e ssRNA ha portato ad un aumento di p24 nei FR (UNST 1,62 pg/mL [0,37-6,65] vs LPS 3,21 pg/mL [1,05-15,30] $p=.068$; vs ssRNA 2,95 pg/mL [0,91-15,49] $p=.010$; Fig.9d) ma non negli INR (UNST 2,63 pg/mL [0,14-10,33] vs LPS 2,37 pg/mL [1,14-11,45] $p=.820$; vs ssRNA 9,12 pg/mL [0,079-25,37] $p=.193$; Fig.9d). Infine, confrontando i due gruppi tra di loro, non abbiamo riscontrato alcuna differenza significativa (UNST $p=.701$; LPS $p=.597$; ssRNA $p=.464$; Fig.9d).

DISCUSSIONE

In accordo con quanto ampiamente descritto in letteratura, i soggetti HIV-positivi naive per la terapia antiretrovirale mostravano livelli di attivazione T cellulare significativamente più alti rispetto alla controparte HIV-negativa [87]. In tali pazienti, però, l'esposizione a ligandi dei TLR non si è tradotta in un aumento dell'attivazione delle cellule T, così come non ha avuto effetto alcuno sulla produzione di p24 da parte di PBMC e MDM.

La stimolazione dei TLR, in maniera del tutto inaspettata, non ha determinato nessuna differenza di attivazione nemmeno sulle cellule macrofagiche. Sebbene non abbiamo dati sulla produzione citochinica dai macrofagi stimolati, i nostri risultati sono in apparente contrasto con evidenze di letteratura che dimostrano come l'attivazione macrofagica sostenuta da stimolazione dei TLRs (TLR2, stimolazione con Pam3CSK4), porti ad produzione di TNF- α e ad up-regolazione di RANTES, IL-8 e Mip-1 α [6].

Questi dati sembrerebbero suggerire un'ipotesi secondo cui la mancanza di risposta alla stimolazione dei TLR da parte dei soggetti naive alla HAART sia attribuibile all'elevata attivazione immune che caratterizza questi pazienti. Il sistema immunitario già attivato al massimo non riuscirebbe ad affrontare una nuova sfida e di conseguenza l'esposizione dei TLR a stimolazioni batteriche e virali non esita in un'ulteriore attivazione.

Una seconda ipotesi potrebbe invece riguardare il fenomeno della tolleranza. È stato dimostrato che la continua esposizione a LPS rende le cellule del sistema immunitario tolleranti, facendo sì che non si attivino in presenza della molecola antigenica [115]. Poiché i soggetti naive alla terapia antiretrovirale hanno livelli di traslocazione microbica più alti [18], è possibile ipotizzare un modello in cui l'elevata traslocazione microbica rende le cellule tolleranti e quindi stimoli successivi non sono in grado di attivare la risposta immunitaria.

Molto diverso è invece il discorso dei pazienti in corso di HAART. In questo caso, la stimolazione dei TLR si associa ad una generalizzata immuno-attivazione in accordo al grado di recupero T linfocitario dopo terapia. Gli INR tendono ad attivarsi in seguito a qualunque tipo di stimolazione, contrariamente ai FR che si attivano molto soprattutto dopo stimolazione con CD3/CD28. Tale osservazione potrebbe riflettere il ruolo della HAART nel ripristinare almeno parzialmente le fisiologiche funzioni dei linfociti T, che negli INR sembrano essere più facilmente attivabili.

Alcuni lavori hanno mostrato una sensibile diminuzione dell'espressione di HLA-DR sui macrofagi in corso di infezione da HIV, ad indicare una ridotta funzionalità di tali cellule [116]. Tuttavia, nel nostro studio non abbiamo riscontrato differenze sensibili tra soggetti HIV-positivi e controlli HIV-negativi, probabilmente come conseguenza della coltura

cellulare prolungata, che avrebbe selezionato solo le cellule "più resistenti" e di conseguenza quelle più funzionali.

In modo interessante la sola stimolazione con ssRNA è stata in grado di indurre l'espressione del marcatore di attivazione CD69 sui macrofagi in entrambi i gruppi in studio, dato questo confermato anche dalla misurazione del CD14 solubile rilasciato dalla coltura macrofagica. Tali osservazioni sembrano supportare il ruolo fortemente immuno-stimolatorio delle componenti virali nei confronti dell'immunità innata.

La discrepanza fra attivazione macrofagica e T-linfocitaria suggerisce che i difetti immunologici che si rendono responsabili della progressiva leucopenia CD4-relata non sono presenti nelle prime fasi di riconoscimento fra antigene e APC, bensì a valle della cascata di trasduzione del segnale interessando il comparto T-cellulare.

Lo stimolo ssRNA sembra essere coinvolto anche nella riattivazione virale, inducendo il rilascio di p24 sia negli INR che nei FR, suggerendo un ruolo della stimolazione virale nel riattivare HIV, come se il virus promuovesse la replicazione di se stesso.

PARTE III.

Studio dei *reservoir* virali

MATERIALI E METODI

Reclutamento Pazienti.

26 pazienti HIV-positivi sono stati arruolati consecutivamente presso la Clinica di Malattie Infettive e Tropicali, Università di Milano, Ospedale San Paolo, Milano.

Criteri di inclusione nello studio:

- ✓ no co-infezione epatitica con virus C
- ✓ in terapia antiretrovirale stabile da almeno 12 mesi, con carica virale soppressa (HIV-RNA < 40cp/mL) in almeno tre determinazioni consecutive

I pazienti sono stati suddivisi in 2 gruppi, in accordo con il grado di immuno-ricostituzione in corso di HAART:

1. *Complete Responders* (CR): CD4 ≥ 500/mm³
2. *Partial Responders* (PR): CD4 < 500/mm³

Come gruppo di controllo sono stati arruolati 4 Long-Term Non Progressors (LTNP) con CD4 > 500/mm³ da almeno 7 anni in assenza di terapia antiretrovirale.

Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato, approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale.

Citofluorimetria.

Le PBMC sono state marcate con i seguenti anticorpi fluorocromati: CD3 Alexa 700, CD8 Pacific Blue, CD45RA ACP-H7, CCR7 PE-Cy7, CD25 APC, CD14 V500, CD19 AmCyan, Viivid AmCyan, HLA-DR PerCP, CD38 PE, Ki67 FITC, CCR4 PE-Cy7, CXCR3 PE-Cy5, AXCR5 Alexa 488, CCR6 PE, CD127 PE-texas red (BD Bioscience, San Diego, CA), CD4 Qdot605, CD27 Qdot655 (Lifetech - Invitrogen, MB, Italia), CD4 BV650, PD-1 BV421 (eBioscience, San Diego, CA).

In particolare, abbiamo misurato parametri di attivazione (HLA-DR/CD38/CD25), proliferazione (Ki67) e maturazione (CD45RA/CCR7/CD27) su linfociti T CD4 e CD8, solo sui linfociti T CD4 abbiamo misurato l'espressione di CD127 e PD-1. Abbiamo inoltre valutato i diversi subset di linfociti T CD4: Th1 (CXCR3+CCR6-), Th1Th17 (CXCR3+CCR6+), Th2 (CCR4+CCR6-), Th17 (CCR4+CCR6+), Tfh (CXCR5+CXCR3-), Treg (CD25+CD127+).

I due cocktail utilizzati sono i seguenti:

CD3/CD4/CD8/CD45RA/CD27/CCR7/CD14/CD19/Viivid/HLA-DR/CD38/CD25/Ki67

CD3/CD4/CD45RA/CCR4/CXCR3/CXCR5/Viivid/PD-1/CCR6/CD127/CD25

Brevemente, $0,5 \times 10^6$ PBMC/cocktail sono state marcate per 30 min al buio a 4°C , successivamente sono state lavate con PBS, fissate con formaldeide 2% e analizzate usando LSRII (BD Bioscience, San Diego, CA). Un passaggio aggiuntivo di permeabilizzazione si è reso necessario per la marcatura intracellulare dell'antigene nucleare Ki67. I dati sono stati analizzati con il software FlowJo (versione 9)

Separazione linfociti T CD4

Le PBMC conservate in azoto liquido sono state scongelate in RPMI con 10% FBS. Solo i campioni per i quali la vitalità cellulare, valutata con trypan blue, era maggiore di 85-90% sono stati utilizzati per gli esperimenti successivi.

Mediante selezione negativa, sfruttando un sistema di biglie magnetiche (EasySep, StemCell Tech), sono stati isolati i linfociti T CD4. In breve, le PBMC sono state incubate per 15 minuti con il cocktail di anticorpi, successivamente è stata aggiunta una sospensione di nanoparticelle magnetiche e la provetta è stata incubata per 20 minuti in un magnete. Al termine della procedura abbiamo ottenuto una sospensione di linfociti T CD4, con una purezza del 98%. La purezza della separazione è stata valutata mediante citofluorimetria. Le cellule sono state incubate per 30 minuti al buio a 4°C con i seguenti anticorpi fluorocromati: CD3 Pacific Blue, CD4 Alexa 700, CD8 PerCPCy5.5, Viivid AmCyam (BD Bioscience, San Diego, CA) e CD14 FITC (Beckman Coulter, Miami, FL). Le cellule sono state analizzate con LSRII (BD Bioscience, San Diego, CA) e con il software FlowJo (versione 9).

Quantificazione HIV-DNA totale, integrato e 2-LTR

I CD4 isolati (1×10^6) sono stati incubati O/N a 55°C con un buffer di lisi, contenente proteinasi K. Il lisato così ottenuto è stato usato direttamente per l'amplificazione. Le diverse forme molecolari del genoma di HIV sono state pre-amplificate con una prima PCR qualitativa (amplificazione di LTR-gag per HIV-DNA totale, di Alu-LTR per HIV-DNA integrato e della giunzione 2LTR). I prodotti sono stati successivamente amplificati con una PCR nested all'interno del Rotor Gene Q (Qiagen) con primer (Integrated DNA Technologies, San Diego, CA) e sonde TaqMan specifici (TIB-biomol, Adelphia, NJ). Per la curva standard della PCR per HIV-DNA totale e integrato abbiamo amplificato diluizioni seriali di cellule ACH2 (US National Institute of Allergy and Infectious Diseases Reagent Program) in un intervallo da 3×10^6 a 3 cellule. Per la curva standard della PCR per 2-LTR, abbiamo usato diluizioni seriali di un plasmide contenente una singola copia di CD3 e della giunzione 2-LTR.

Di seguito sono elencate le concentrazioni e i protocolli per la fase di pre-amplificazione

HIV-DNA TOTALE	Final[]	HIV-DNA INTEGRATO	Final[]	CIRCOLI 2-LTR	Final[]
ddH ₂ O	-	ddH ₂ O	-	ddH ₂ O	-
Taq Buffer 10X Invitrogen	1X	Taq Buffer 10X Invitrogen	1X	Taq Buffer 10X Invitrogen	1X
MgCl ₂ 50mM Invitrogen	3mM	MgCl ₂ 50mM Invitrogen	3mM	MgCl ₂ 50mM Invitrogen	3mM
dNTP 10mM each	300μM	dNTP 10mM each	300μM	dNTP 10mM each	300μM
HCD3OUT5' 50μM	300nM	HCD3OUT5' 50μM	300nM	HCD3OUT5' 50μM	300nM
HCD3OUT3' 50μM	300nM	HCD3OUT3' 50μM	300nM	HCD3OUT3' 50μM	300nM
LF1 new 50μM	300nM	LF1 new 50μM	150nM	LLTRF1 50μM	300nM
R1 50μM	300nM	Alu1 50μM	300nM	LTRR1 50μM	300nM
-	-	Alu2 50μM	300nM	-	-
Taq Invitrogen (5U/μl)	2.5U	Taq Invitrogen (5U/μl)	2.5U	Taq Invitrogen (5U/μl)	2.5U

HIV-DNA TOTALE	°C	tempo	HIV-DNA INTEGRATO	°C	tempo	CIRCOLI 2-LTR	°C	tempo
Denaturazione	95	8min	Denaturazione	95	8min	Denaturazione	95	8min
	95	1min		95	1min		95	30sec
12* cicli	55	40sec	12* cicli	55	1min	12* cicli	55	30sec
	72	1min		72	10min		72	1min
Allungamento	72	15min	Allungamento	72	15min	Allungamento	72	5min
Conservazione	4	-	Conservazione	4	-	Conservazione	4	-

Di seguito sono elencate le concentrazioni e i protocolli per la fase di quantificazione tramite Real-Time PCR all'interno del Rotor Gene Q

HIV-DNA TOT/INT	Final[]	CD3	Final[]	CIRCOLI 2-LTR	Final[]
ddH ₂ O	-	ddH ₂ O	-	ddH ₂ O	-
Rotor Gene Probe mastermix	1X	Rotor Gene Probe mastermix	1X	Rotor Gene Probe mastermix	1X
Lambda T 100 μM	1250nM	CD3 IN 5' 100 μM	1250nM	Lambda T 100 μM	1250nM
R2 100 μM	1250nM	CD3 IN 3' 100 μM	1250nM	LTRR2 100 μM	1250nM
HIV Taq 8μM	200nM	CD3 Taq 8μM	200nM	2LTR Taq 8μM	200nM

HIV-DNA TOT/INT	°C	tempo	CD3	°C	tempo	CIRCOLI 2- LTR	°C	tempo
Denaturazione	95	4min	Denaturazione	95	4min	Denaturazione	95	4min
40* cicli	95	3 sec	40* cicli	95	3 sec	40* cicli	95	3 sec
	60	10sec		60	10sec		60	10sec

Saggio di riattivazione virale

I CD4 isolati sono stati piastrati ad una densità di 5×10^6 cellule/pozzetto. Le cellule sono state messe in coltura in terreno R10 (RPMI, 10% di FBS, pen/strep 1X) in presenza di un cocktail di antiretrovirali (ARV 100X: AZT 180mM, EFV 100nM, RAL 200 nM) per impedire al virus di infettare nuove cellule. I CD4 sono stati stimolati con:

- inibitore di HDAC, SAHA: 250 nM (Sigma-Aldrich)
- IL-7: 10ng/mL (R&D System)
- Prostatina: 250 nM (Sigma-Aldrich)
- antiCD3/antiCD28: 1 biglia/cellula (Lifetech - Invitrogen) come controllo positivo

Al giorno 3, 500µL di surnatante sono stati raccolti, ultracentrifugati (25000g per 1h a 4°C) e congelati; alla coltura sono stati riaggiunti 500µL di R10 contenente ARV 1X e i diversi stimoli. Al giorno 6, 500µL di surnatante sono stati raccolti, ultracentrifugati e congelati per la quantificazione successiva di HIV.

Estrazione HIV-RNA

L'HIV-RNA contenuto nel surnatante delle colture cellulari è stato estratto usando QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), secondo quanto riportato dalla casa costruttrice.

Quantificazione HIV-RNA

L'RNA di HIV estratto è stato sottoposto per 10 minuti a 25°C ad un trattamento con DNasi (Lifetech - Invitrogen), la cui azione è stata fermata dall'aggiunta di EDTA per 10 minuti a 65°C. Il materiale così ottenuto è stato retrotrascritto a cDNA (SuperScript III ONE-step RT-PCR, Lifetech - Invitrogen) e pre-amplificato.

Di seguito sono riportate le condizioni di reazione:

RT-PCR	Volume (uL)	RT-PCR	°C	Tempo
2X mix reazione	25	RT	50	30min
LF1 new 50uM	0.5	Denaturazione	94	2min
R1 50uM	0.5		94	15sec
Superscript/Taq Mix	2	16* cicli	55	30sec
RNA	22		68	1min
		Allungamento	68	5min
		Conservazione	4	

Una volta finito lo step di retrotrascrizione/pre-amplificazione, abbiamo quantificato la produzione di HIV nel surnatante mediante Real-Time PCR, con lo stesso protocollo descritto in precedenza per la quantificazione di HIV-DNA totale, in modo da ricavare il numero assoluto di cDNA di HIV presente nel campione. La curva standard è stata creata aggiungendo 1.059.000 copie di HIV-RNA prodotte dalle cellule ACH2 in 1 ml di R10. Il campione è stato ultracentrifugato e poi estratto come descritto in precedenza. Dopo averne fatto diluizioni seriali anche la curva standard è stata retrotrascritta e pre-amplificata in modo che subisse gli stessi passaggi dei campioni.

Misurazione livelli plasmatici di Interleuchina (IL)-2 e Interleuchina (IL)-7.

I livelli circolanti di IL-2 e IL-7 sono stati misurati su campioni di plasma congelato, tramite metodica ELISA, in accordo con quanto specificato nel foglietto illustrativo (R&D System, Minneapolis, MN)

Analisi statistiche.

Le variabili continue sono state presentate come mediane e range interquartili (25°-75° percentile), mentre i dati categorici sono stati presentati come numeri assoluti e percentuali. Il Mann Whitney U test, il test di Wilcoxon e il Chi-quadrato sono stati utilizzati per le analisi tra 2 gruppi. Il Kruskal-Wallis è stato usato per il confronto tra CR/PR/LTNP. I parametri per i quali il valore p è risultato minore di 0.05 con il Kruskal-Wallis sono stati ulteriormente analizzati con il Mann-Whitney. Le associazioni tra i diversi parametri sono state valutate con il test di Spearman. Un valore $p < 0.05$ è stato considerato significativo. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism 5.

RISULTATI

Caratteristiche dei pazienti in studio.

Sulla base della conta CD4, abbiamo suddiviso i 26 soggetti in terapia antiretrovirale in 14 CR ($CD4 \geq 500/mm^3$) e 12 PR ($CD4 < 500/mm^3$).

Dal confronto di CR e PR con il gruppo dei LTNP è emerso che i tre gruppi erano paragonabili per durata dell'infezione di HIV (CR: 12 anni [7-16], PR: 9 anni [5-17], LTNP 8,5 anni [7-11]; $p=.75$; Tabella 7) e per conta di CD8 (CR: 973/ mm^3 [667-1224], PR: 913/ mm^3 [352-1104], LTNP: 1364/ mm^3 [612-1601]; $p=.54$; Tabella 7). Al contrario, abbiamo osservato marcate differenze per quanto riguarda il numero di CD4 al momento dell'arruolamento (CR: 860/ mm^3 [750-1020], PR: 367/ mm^3 [303-406], LTNP: 689/ mm^3 [589-791]; $p<.0001$; Tabella 7), con i LTNP che avevano una conta CD4 minore rispetto ai CR ($p=.047$), ma significativamente più alta rispetto ai PR ($p=.004$). Differenze sono state osservate anche nei livelli di carica virale (CR: 1,59 Log cp/mL [1,59-1,59]; PR: 1,59 Log cp/mL [1,59-1,59]; LTNP: 3,06 [1,95-3,71]; $p=.001$; Tabella 7), con i LTNP che si caratterizzavano per cariche virali più alte sia rispetto ai CR ($p=.003$) sia rispetto ai PR ($p=.004$).

I pazienti in terapia erano paragonabili tra di loro per durata della terapia (7 anni [4-12] vs 4,5 anni [2-11] $p=.18$; Tabella), per tipo di terapia e per nadir CD4 (285/ mm^3 [129-365] vs 145/ mm^3 [62-249] $p=.165$; (Tabella 7), ma presentavano una conta CD4 differente ($p<.0001$), come definito dai criteri di inclusione.

Nessun'altra differenza nei parametri demografici, clinici e HIV correlati è stata osservata (Tabella 7).

I LTNP mostrano un fenotipo più attivato rispetto ai pazienti in corso di terapia antiretrovirale.

Un'analisi dell'attivazione T-cellulare, definita come la co-espressione di HLA-DR e CD38, ha rivelato importanti differenze tra LTNP, CR e PR. In particolare, livelli significativamente diversi di HLA-DR+CD38+ sono stati osservati a carico del comparto CD8 (CR: 4,61% [2,82-6,42] vs PR: 5,4% [2,24-6,94] vs LTNP: 9,71% [6,93-18,48]; $p=.044$; Fig.10a), con i LTNP che mostravano una maggiore attivazione sia rispetto ai CR ($p=.017$; Fig.10a) sia ai PR ($p=.043$; Fig.10a), mentre non c'era nessuna differenza tra i due gruppi in terapia ($p=.603$; Fig.10a). Un comportamento analogo è stato riscontrato anche nel comparto CD4, senza tuttavia risultare significativo da un punto di vista statistico (CR: 2,86% [2,07-3,69] vs PR: 2,29% [1,5-3,39] vs LTNP: 3,55% [1,29-6,99]; $p=.382$; Fig.10b).

Anche per quanto riguarda i livelli di Ki67+CD8, i LTNP si sono caratterizzati per livelli più alti (CR: 1,74% [1,17-3,58] vs PR: 1,42% [1,2-1,88] vs LTNP: 3,24% [2,66-3,43]; $p=.060$; Fig.10C), risultando però significativi solo verso i PR (LTNP vs CR $p=.152$; LTNP vs PR $p=.011$; CR vs PR $p=.396$; Fig.10C). Nessuna differenza, invece, è stata osservata nel comparto CD4 (CR: 1,87% [1,41-2,59] vs PR: 2,39% [1,87-2,95] vs LTNP: 3,38% [1,9-3,59]; $p=.363$; Fig.10d).

Analogamente, l'espressione di PD-1 sui linfociti CD4 è risultata paragonabile tra i tre gruppi in studio (CR: 24,3% [13,3-28,2] vs PR: 25,4% [15,2-29,7] vs LTNP: 24,7% [20,1-35,1]; $p=.712$; Fig.10e).

Abbiamo inoltre deciso di studiare il sistema di Interleuchina (IL-2) e di interleuchina (IL)-7 visto il loro possibile coinvolgimento nel mantenimento e nell'eradicazione dei reservoir di HIV [65].

Per quanto riguarda il sistema di IL-2, i PR hanno mostrato maggiori livelli di CD25 sui linfociti T CD4 (CR: 2,48% [0,82-3,91] vs PR: 4,4% [2,03-4,7] vs LTNP: 1,39% [0,59-2,16]; $p=.363$; Fig.10f), raggiungendo la significatività solo quando confrontati con il gruppo dei LTNP (LTNP vs CR $p=.222$; LTNP vs PR $p=.050$; CR vs PR $p=.119$; Fig.10f). Questo comportamento si è riflesso anche nei livelli plasmatici di IL-2, seppur non raggiungendo la significatività statistica (CR: 0pg/mL [0-78,1] vs PR: 4,1pg/mL [0-66,8] vs LTNP: 0pg/mL [0-2,7]; $p=.544$; Fig.10g).

Al contrario, nessuna differenza è stata osservata nel sistema IL-7/IL-7R, sia in termini di espressione di CD127 sui CD4 (CR: 81,4% [73,75-87,8] vs PR: 79,2% [59,6-85,4] vs LTNP: 83,8% [60,9-86]; $p=.636$; Fig.10h), sia in termini di livelli plasmatici di citochina (CR: 11pg/mL [5,8-17,5] vs PR: 12,3pg/mL [5,6-19,6] vs LTNP: 7,3pg/mL [4,97-12,6]; $p=.544$; Fig.10i).

I soggetti in terapia con diversa risposta immunologica e i LTNP non mostrano differenze significative nella distribuzione dei diversi subset T-linfocitari.

Poichè i pazienti HIV-positivi si caratterizzano per un alterato pattern di maturazione T-linfocitario [117], abbiamo studiato nei tre gruppi le cellule naive, le cellule a differenziazione terminale (TD), le cellule di memoria centrale (CM), effettrici (EM) e di transizione (TM).

In particolare, per quanto riguarda il subset CD4, non abbiamo osservato alcuna differenza tra i tre gruppi in studio nella proporzione di cellule naive (CR: 35,1% [22,4-41,93] vs PR: 31,2% [24,5-58,8] vs LTNP: 41,7% [23,03-58,2]; $p=.777$; Fig.11a), TD (CR: 1,98% [0,17-

3,34] vs PR: 0,66% [0,079-4,13] vs LTNP: 1,51% [0,66-5,81]; p=.739; Fig.11b), EM (CR: 6,19% [2,42-14,03] vs PR: 9,13% [1,49-16,5] vs LTNP: 22,9% [7,64-36]; p=.239; Fig.11c) e TM (CR: 8,36% [5,01-13,05] vs PR: 8,89% [4,72-14,7] vs LTNP: 4,51% [3,97-6,32]; p=.125; Fig.11d). L'unica differenza riguardava la proporzione di CM (CR: 36,75% [29,8-46,9] vs PR: 33,5% [22,6-39] vs LTNP: 22,6% [19,03-29,3]; p=.082; Fig.11e), con i CR che mostravano una proporzione maggiore rispetto ai LTNP (LTNP vs CR p=.038; LTNP vs PR p=.133; CR vs PR p=.338; Fig.11e).

Nessuna differenza tra i gruppi è stata invece osservata nel comparto CD8 per quanto concerne la proporzione di cellule naive (CR: 13,25% [8,19-39,78] vs PR: 18,6% [6,82-35,2] vs LTNP: 23,66% [8,28-39,98]; p=.686; Fig.11f), TEMRA (CR: 15,15% [9,98-34,7] vs PR: 14% [9,1-32,4] vs LTNP: 14,75% [10,7-21,08]; p=.917; Fig.11g), EM (CR: 12,55% [18,73-18,23] vs PR: 21,8% [10,5-34,4] vs LTNP: 18,95% [13,55-32,45]; p=.186; Fig.11h), CM (CR: 11,9% [9,23-20,16] vs PR: 9,35% [3,78-11,9] vs LTNP: 6,24% [3,1-13,1]; p=.636; Fig.11i) e TM (CR: 13,85% [11,2-18,7] vs PR: 12,2% [10,7-14,8] vs LTNP: 19,3% [15,9-24,2]; p=.129; Fig.11l).

Come ultimo passaggio, abbiamo studiato la distribuzione dei diversi sottotipi di linfociti T CD4 nei tre gruppi.

Sebbene CR, PR e LTNP abbiamo mostrato equiparabili livelli di Th1 (CR: 65% [49,4-73] vs PR: 72,3% [60,9-78,3] vs LTNP: 70,1% [68,5-71,7]; p=.426; Fig.12a), Th2 (CR: 46,7% [34,9-54,7] vs PR: 51,3% [45,5-58,5] vs LTNP: 47,8% [44,8-50,8]; p=.625; Fig.12b), Th17 (CR: 41,6% [39,3-55,9] vs PR: 38,7% [31,5-45,81] vs LTNP: 42,3% [37,9-47]; p=.582; Fig.12c), Th1-Th17 (CR: 28,9% [20,3-40,2] vs PR: 21% [14,7-28,4] vs LTNP: 21,6% [19,8-23,4]; p=.394; Fig.12d) e Tfh (CR: 11,5% [10,2-13,8] vs PR: 8,12% [6,41-14,6] vs LTNP: 8,98% [5,56-12,4]; p=.598; Fig.12e), una tendenza verso più bassi livelli di Treg è stata riscontrata nel gruppo dei CR (CR: 0,69% [0,19-0,88] vs PR: 1,79% [0,87-3,06] vs LTNP: 1,81% [0,81-2,82]; p=.083; Fig.12f), raggiungendo la significatività nel confronto con i PR (LTNP vs CR p=.207; LTNP vs PR p=.889; CR vs PR p=.046; Fig.12f).

L'entità dei reservoir virali di HIV sembra essere diversa nei pazienti in terapia rispetto ai LTNP.

Le dimensioni dei reservoir virali sono state valutate misurando le tre diverse forme genomiche di HIV: DNA totale, DNA integrato e circoli 2-LTR.

I soggetti LTNP sembravano caratterizzarsi per un maggior contenuto di DNA totale, seppur non significativo da un punto di vista statistico (CR: 995 cp/10⁶CD4 [574-2466] vs PR: 729

cp/10⁶CD4 [239-2199] vs LTNP: 2209 cp/10⁶CD4 [607-4214]; p=.544; Fig.13a). Medesimo comportamento è stato riscontrato per il DNA di HIV integrato (CR: 140 cp/10⁶CD4 [54-399] vs PR: 117 cp/10⁶CD4 [63-274] vs LTNP: 385 cp/10⁶CD4 [80-656]; p=.652; Fig.13b) e per i 2-LTR (CR: 13 cp/10⁶CD4 [2-95] vs PR: 19 cp/10⁶CD4 [7-65] vs LTNP: 42 cp/10⁶CD4 [39-107]; p=.421; Fig.13c).

Poichè ad oggi, di grande fascino e interesse sono le strategie di eradicazione di HIV [51], abbiamo voluto indagare la capacità dei CD4 di rispondere ad agenti in grado di riattivare il virus nei nostri pazienti.

Il gruppo CR ha mostrato un aumento della produzione virale in seguito a stimolazione con IL-7 (UNST 0 cp/10⁶CD4 [0-18] vs IL-7 5,5 cp/10⁶CD4 [0-2488]; p=.094; Fig.13d) e CD3/CD28 (1618 cp/10⁶CD4 [7-7377] p=.0037; Fig.13d), mentre non ha risposto alla stimolazione con SAHA (3 cp/10⁶CD4 [0-795] p=.844; Fig.13d). I pazienti PR hanno invece aumentato la produzione di HIV solo dopo stimolazione con CD3/CD28 (UNST 0 cp/10⁶CD4 [0-35,5] vs IL-7 35,5 cp/10⁶CD4 [0-25722], p=.5; SAHA 5,75 cp/10⁶CD4 [0-2435], p=.844; CD3/CD28 579 cp/10⁶CD4 [10-7167]; p=.008; Fig.13e). Al contrario, i LTNP non hanno risposto ad alcuno stimolo (UNST 11550 cp/10⁶CD4 [1603-183706] vs SAHA 189242 cp/10⁶CD4 [16062-362421], p=1; CD3/CD28 122146 cp/10⁶CD4 [33011-632282]; p=.25; Fig.13f).

Tuttavia, confrontando i gruppi tra di loro sono emerse delle differenze interessanti. I LTNP, infatti si caratterizzavano per una più alta produzione spontanea di virus (p=.168) che diventava significativa dopo stimolazione con SAHA (p=.088) e con CD3/CD28 (p=.034). Anche quando abbiamo confrontato i gruppi a due a due, i LTNP hanno mostrato una produzione virale maggiore (UNST: LTNP vs CR p=.156, LTNP vs PR p=.066; SAHA: LTNP vs CR p=.056, LTNP vs PR p=.047; CD3/CD28 LTNP vs CR p=.022, LTNP vs PR p=.016). Nessuna differenza è stata osservata tra CR e PR (UNST p=.711; IL-7 p=.937; SAHA p=.641; CD3/CD28 p=.934).

La quantità di DNA totale di HIV correla con l'attivazione delle cellule T CD4 e con la loro capacità di riattivare il virus dopo stimolazione.

Abbiamo infine deciso di indagare se le misure di persistenza virale correlassero con i parametri immunologici nei pazienti con diversa risposta alla HAART.

Tra le correlazioni significative, alcune sono tuttavia risultate un pochino deboli (valore assoluto di rho<0.5).

In modo interessante, la misura del DNA totale di HIV correla positivamente con l'attivazione (HLA-DR+CD38+) delle cellule T CD4 ($\rho=0.56$, $p=.004$; Fig.14a) e con la proporzione di cellule CD4 memory ($\rho=0.74$ $p=.033$; Fig.14b), mentre correla negativamente con la proporzione di cellule CD4 naive ($\rho=-0.49$ $p=.024$; Fig.14c).

Inoltre, abbiamo osservato una correlazione positiva tra HIV-DNA totale e la produzione virale spontanea ($\rho=0.47$ $p=.017$; Fig.14d), dopo stimolazione con IL-7 ($\rho=0.74$; $p=.004$; Fig.14e), con SAHA ($\rho=0.56$ $p=.007$; Fig.14f) e con CD3/CD28 ($\rho=0.47$ $p=.018$; Fig.14g).

DISCUSSIONE

Contrariamente a quanto descritto in letteratura [17], non abbiamo osservato alcuna differenza in termini di attivazione e proliferazione T-cellulare comparando tra loro PR e CR, seppur entrambi i gruppi mostravano livelli di attivazione più bassi rispetto ai LTNP, a conferma del ruolo della HAART. A parziale spiegazione di ciò, va detto che per quanto i pazienti del gruppo PR non avessero una risposta alla terapia antiretrovirale adeguata, comunque non avevano conte CD4<300/mmc, che sappiamo essere associate a maggiore attivazione T-cellulare e progressione clinica [118].

L'analisi dei *reservoir* di HIV non ha rivelato differenze in termini di DNA totale, integrato e 2-LTR tra CR e PR, sebbene i LTNP sembrerebbero avere livelli maggiori. Queste osservazioni sono in contrasto con dati recentemente pubblicati dal gruppo di S. Deeks, in cui è stato visto che i soggetti con conte di CD4<350/mmc avevano livelli di *reservoir* maggiori [108].

E' stato anche descritto che i livelli di *reservoir* virali correlano positivamente con il nadir CD4 [119]. Poichè nel nostro studio i pazienti erano paragonabili per nadir CD4, è possibile ipotizzare che l'assenza di differenze nei *reservoir* sia attribuibile ad un bias di selezione della casistica.

Il dato più interessante che emerge da quest'ultimo studio riguarda invece l'abilità di alcuni composti di riattivare la replicazione di HIV.

Il rinnovato interesse scientifico degli ultimi anni per i *reservoir* indica la necessità di trovare nuove strategie che possano portare all'eradicazione della malattia [120].

A tal proposito, una strategia interessante per l'eliminazione dei *reservoir* consiste nell'indurre la produzione virale, con molecole come gli inibitori delle iston-deacetilasi (SAHA), gli attivatori di NFκB (Prostratina) e alcune citochine [51, 52, 65].

Per tale motivo abbiamo deciso di testare la capacità di alcune di queste molecole di riattivare il virus in pazienti HIV-positivi in corso di terapia antiretrovirale.

La prima osservazione è che i LTNP rispetto ai pazienti in HAART hanno una produzione virale spontanea maggiore, essendo viremici. In modo interessante, i LTNP non sono in grado di riattivare in modo significativo la produzione virale dopo stimolazione con il controllo positivo CD3/CD28, cosa che invece vediamo sia nei CR sia nei PR. Questo dato potrebbe suggerire che il sistema nei LTNP sta producendo virus al massimo delle potenzialità e non può essere spinto oltre, indicando indirettamente un ruolo della terapia nel mantenere sotto controllo/regolare questo fenomeno.

Dal nostro studio sembra emergere anche la conclusione che molecole come SAHA, considerato un possibile candidato per la riattivazione virale, sono in realtà strade poco praticabili perchè non in grado di riattivare il virus nei CD4 latentemente infetti di soggetti HIV-positivi in corso di HAART virologicamente efficace. Da chiarire è invece il ruolo di IL-7, che sembrerebbe avere una qualche azione nel riattivare il virus almeno in quei pazienti con buon controllo viro-immunologico.

E' infatti stato descritto che IL-7 ha un duplice ruolo nella persistenza di HIV promuovendo la produzione virale, ma anche la proliferazione di cellule infettate in modo latente [65, 66, 121]. Poichè IL-7 è ad oggi in fase di studio come terapia immunoadiuvante [67], il poter sfruttare anche la sua abilità di agente in grado di riattivare il virus rappresenterebbe un duplice vantaggio.

Infine l'osservazione di una correlazione positiva tra HIV-DNA totale e attivazione delle cellule T CD4 suggerisce uno stretto rapporto tra i due fenomeni pur non dando alcuna indicazione sulla causalità di tale rapporto.

Conclusioni Generali

Fattore determinante nella patogenesi della linfopenia T CD4 in corso di infezione da HIV è l'iperattivazione immune che innesca meccanismi di morte cellulare indiretta delle cellule CD4 [11, 13, 15, 86].

Tale fenomeno si rende responsabile anche del mancato recupero dei linfociti T CD4 in corso di terapia antiretrovirale ad alta efficacia (HAART) [13, 17].

Ruolo chiave nella patogenesi dell'immunoattivazione è svolto dalla traslocazione di frammenti microbici dal tratto gastro-intestinale nella circolazione periferica [18]. Dati di letteratura nella popolazione HIV-negativa, inoltre, avvalorano la tesi che componenti batteriche possano essere fattori determinanti nella genesi dell'iperattivazione T-linfocitaria tramite la dimostrazione di come agonisti dei TLR, recettori dell'immunità innata, inducano l'espressione di CD38 su linfociti T CD4 e CD8 [23, 122].

A questo aspetto, si aggiunge l'impossibilità di eradicare il virus, che nascondendosi all'interno di *reservoir* sfugge all'azione della HAART e continua a replicare a basso titolo, rappresentando un ulteriore stimolo attivatore [107].

Scopo dello studio è stato pertanto quello di indagare il ruolo di alcune macromolecole microbiche e dei *reservoir* virali nel mancato recupero T linfocitario in corso di terapia antiretrovirale.

Nel primo studio ci si proponeva di indagare se accanto alla traslocazione microbica vi fosse anche uno squilibrio nella composizione della flora traslocante in soggetti che iniziavano la HAART con conte di CD4 molto basse (<200/mm³). Dai nostri esperimenti è emerso che i pazienti gravemente immuno-compromessi si caratterizzano per un'incapacità di controllare in modo efficace la traslocazione microbica e per una composizione polimicrobica della flora traslocante che non viene modificata in modo sostanziale della terapia. In modo interessante, abbiamo inoltre osservato che i pazienti che non recuperano CD4 dopo terapia hanno una flora traslocante potenzialmente più patogena.

Il secondo studio era volto ad approfondire il ruolo della stimolazione dei TLR nella storia naturale dell'infezione da HIV e in seguito a trattamento HAART. L'ipotesi di partenza era che la stimolazione di PBMC e MDM *in vitro* con i ligandi dei TLR potesse indurre un aumento dell'espressione dei marcatori di attivazione su tali cellule e un aumento della produzione virale in base alla gravità della leucopenia T CD4-relata.

In modo inaspettato, abbiamo osservato comportamenti molto differenti nella storia naturale dell'infezione rispetto ai pazienti in corso di terapia. I pazienti naive, infatti, non sembrano in

grado di rispondere alla stimolazione dei TLR, probabilmente perchè già sottoposti ad una eccessiva immuno-attivazione e perciò non in grado di fronteggiare nuove sfide. Al contrario, i soggetti in terapia che controllano meglio i livelli di attivazione immunitaria sono in grado di rispondere alle stimolazioni virali e batteriche, con delle differenze in base al recupero immunologico in corso di HAART. Sono infatti i soggetti maggiormente immunocompromessi a rispondere più "facilmente" agli stimoli, come se fossero più suscettibili a fenomeni attivatori e tuttavia ciò non si riflette in un'aumentata produzione di HIV, che al contrario sembra risentire solo della presenza di analoghi virali, come ad indicare che negli INR i pochi CD4 recuperati non sono funzionali al 100%.

Il terzo studio voleva saggiare l'ipotesi secondo cui a diversa immuno-ricostituzione corrispondevano diverse dimensioni dei *reservoir* e diversa capacità di risposta agli agenti che riattivano il virus.

Contrariamente a quanto ipotizzato, non abbiamo osservato alcuna differenza nei reservoir di HIV in termini di DNA totale, integrato e 2-LTR tra CR e PR. Così come non sembra esserci grande differenza nell'abilità di riattivare il virus dopo stimolazione con differenti agenti. Da chiarire è il ruolo di IL-7, che sembrerebbe avere una qualche azione nel riattivare il virus almeno in quei pazienti con buon controllo viro-immunologico. Interessante è infine l'osservazione di una correlazione positiva tra HIV-DNA totale e attivazione delle cellule T CD4, confermando la relazione tra la produzione del virus da parte dei CD4 e l'attivazione del sistema immunitario, senza però stabilire il rapporto di causalità.

In conclusione, questo ampio ed articolato studio ha messo in evidenza che la traslocazione microbica (attraverso il sistema dei TLR), molto più dei *reservoir* virali è coinvolta a diverso titolo nei fenomeni di attivazione del sistema immunitario in soggetti HIV-positivi con diverso grado di recupero T-linfocitario dopo introduzione della terapia antiretrovirale.

Da questo studio non sembra emergere una vera e propria relazione tra traslocazione microbica e *reservoir*, sebbene siano necessari ulteriori studi disegnati specificatamente per indagare l'effettivo rapporto tra questi due fenomeni.

E' indubbio che entrambi rappresentano dei bersagli terapeutici interessanti, per lo sviluppo di nuovi composti che possano implementare l'azione della classica HAART. Nuove possibilità terapeutiche sono assolutamente necessarie per migliorare la prognosi proprio di quei pazienti che non rispondono in modo adeguato alla HAART e che ad oggi rappresentano la problematica principale per il clinico. Non è infine da escludere che un intervento terapeutico su uno dei due fenomeni, possa avere delle ricadute benefiche anche sull'altro.

Bibliografia

1. Noursadeghi M, Katz DR, Miller RF. HIV-1 infection of mononuclear phagocytic cells: the case for bacterial innate immune deficiency in AIDS. *Lancet Infect Dis* 2006,**6**:794-804.
2. Douek DC. Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease. *AIDS Rev* 2003,**5**:172-177.
3. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, *et al.* Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* 2005,**115**:3265-3275.
4. Lester RT, Yao XD, Ball TB, McKinnon LR, Kaul R, Wachihi C, *et al.* Toll-like receptor expression and responsiveness are increased in viraemic HIV-1 infection. *Aids* 2008,**22**:685-694.
5. Nicol MQ, Mathys JM, Pereira A, Ollington K, Jeong MH, Skolnik PR. Human immunodeficiency virus infection alters tumor necrosis factor alpha production via Toll-like receptor-dependent pathways in alveolar macrophages and U1 cells. *J Virol* 2008,**82**:7790-7798.
6. Heggelund L, Muller F, Lien E, Yndestad A, Ueland T, Kristiansen KI, *et al.* Increased expression of toll-like receptor 2 on monocytes in HIV infection: possible roles in inflammation and viral replication. *Clin Infect Dis* 2004,**39**:264-269.
7. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004,**303**:1526-1529.
8. Martinson JA, Roman-Gonzalez A, Tenorio AR, Montoya CJ, Gichinga CN, Rugeles MT, *et al.* Dendritic cells from HIV-1 infected individuals are less responsive to toll-like receptor (TLR) ligands. *Cell Immunol* 2007,**250**:75-84.
9. Sachdeva N, Asthana V, Brewer TH, Garcia D, Asthana D. Impaired restoration of plasmacytoid dendritic cells in HIV-1-infected patients with poor CD4 T cell reconstitution is associated with decrease in capacity to produce IFN-alpha but not proinflammatory cytokines. *J Immunol* 2008,**181**:2887-2897.
10. Schmidt B, Ashlock BM, Foster H, Fujimura SH, Levy JA. HIV-infected cells are major inducers of plasmacytoid dendritic cell interferon production, maturation, and migration. *Virology* 2005,**343**:256-266.
11. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, *et al.* Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more

- closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999,**179**:859-870.
12. Giorgi JV, Lyles RH, Matud JL, Yamashita TE, Mellors JW, Hultin LE, *et al.* Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002,**29**:346-355.
 13. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, *et al.* T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2003,**187**:1534-1543.
 14. Biancotto A, Grivel JC, Iglehart SJ, Vanpouille C, Lisco A, Sieg SF, *et al.* Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood* 2007,**109**:4272-4279.
 15. Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, Guo H, Gascon R, Narvaez AB, *et al.* Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 2004,**104**:942-947.
 16. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* 2006,**7**:235-239.
 17. Marchetti G, Gori A, Casabianca A, Magnani M, Franzetti F, Clerici M, *et al.* Comparative analysis of T-cell turnover and homeostatic parameters in HIV-infected patients with discordant immune-virological responses to HAART. *AIDS* 2006,**20**:1727-1736.
 18. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006,**12**:1365-1371.
 19. Bafica A, Scanga CA, Schito M, Chaussabel D, Sher A. Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of Toll-like receptors. *J Immunol* 2004,**172**:7229-7234.
 20. Heggelund L, Damas JK, Yndestad A, Holm AM, Muller F, Lien E, *et al.* Stimulation of toll-like receptor 2 in mononuclear cells from HIV-infected patients induces chemokine responses: possible pathogenic consequences. *Clin Exp Immunol* 2004,**138**:116-121.
 21. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999,**11**:115-122.

22. Villacres MC, Literat O, DeGiacomo M, Du W, Frederick T, Kovacs A. Defective response to Toll-like receptor 3 and 4 ligands by activated monocytes in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2008,**15**:137-144.
23. Funderburg N, Luciano AA, Jiang W, Rodriguez B, Sieg SF, Lederman MM. Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PLoS ONE* 2008,**3**:e1915.
24. Koga R, Hamano S, Kuwata H, Atarashi K, Ogawa M, Hisaeda H, *et al.* TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 2006,**177**:7059-7066.
25. Palella FJ, Delaney K, Moorman A, Loveless M, Fuhrer J, Satten G, *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998,**338**:853-860.
26. van Sighem AI, Gras LA, Reiss P, Brinkman K, de Wolf F, study Anoc. Life expectancy of recently diagnosed asymptomatic HIV-infected patients approaches that of uninfected individuals. *AIDS* 2010,**24**:1527-1535.
27. Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, *et al.* Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997,**278**:1291-1295.
28. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, *et al.* Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997,**278**:1295-1300.
29. Davey RT, Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R, *et al.* HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999,**96**:15109-15114.
30. Chun TW, Davey RT, Ostrowski M, Shawn Justement J, Engel D, Mullins JI, *et al.* Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* 2000,**6**:757-761.
31. García F, Plana M, Vidal C, Cruceta A, O'Brien WA, Pantaleo G, *et al.* Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS* 1999,**13**:F79-86.

32. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, *et al.* Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997,**387**:183-188.
33. Bosque A, Planelles V. Induction of HIV-1 latency and reactivation in primary memory CD4+ T cells. *Blood* 2009,**113**:58-65.
34. Cameron PU, Saleh S, Sallmann G, Solomon A, Wightman F, Evans VA, *et al.* Establishment of HIV-1 latency in resting CD4+ T cells depends on chemokine-induced changes in the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010,**107**:16934-16939.
35. Brady T, Agosto LM, Malani N, Berry CC, O'Doherty U, Bushman F. HIV integration site distributions in resting and activated CD4+ T cells infected in culture. *AIDS* 2009,**23**:1461-1471.
36. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, *et al.* HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 2009,**15**:893-900.
37. Carter CC, Onafuwa-Nuga A, McNamara LA, Riddell J, Bixby D, Savona MR, *et al.* HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat Med* 2010,**16**:446-451.
38. Gorry PR, Howard JL, Churchill MJ, Anderson JL, Cunningham A, Adrian D, *et al.* Diminished production of human immunodeficiency virus type 1 in astrocytes results from inefficient translation of gag, env, and nef mRNAs despite efficient expression of Tat and Rev. *J Virol* 1999,**73**:352-361.
39. Churchill MJ, Wesselingh SL, Cowley D, Pardo CA, McArthur JC, Brew BJ, *et al.* Extensive astrocyte infection is prominent in human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann Neurol* 2009,**66**:253-258.
40. Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Meyers JH, Roby G, Hallahan CW, *et al.* Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2008,**197**:714-720.
41. Yukl SA, Gianella S, Sinclair E, Epling L, Li Q, Duan L, *et al.* Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV-positive patients receiving suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2010,**202**:1553-1561.
42. Fischer-Smith T, Croul S, Sverstiuk AE, Capini C, L'Heureux D, Régulier EG, *et al.* CNS invasion by CD14+/CD16+ peripheral blood-derived monocytes in HIV

- dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection. *J Neurovirol* 2001,**7**:528-541.
43. Thacker TC, Zhou X, Estes JD, Jiang Y, Keele BF, Elton TS, *et al.* Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus type 1 transcription in CD4+ T cells. *J Virol* 2009,**83**:150-158.
44. Cu-Uvin S, DeLong AK, Venkatesh KK, Hogan JW, Ingersoll J, Kurpewski J, *et al.* Genital tract HIV-1 RNA shedding among women with below detectable plasma viral load. *AIDS* 2010,**24**:2489-2497.
45. van Leeuwen E, Ter Heine R, van der Veen F, Repping S, Beijnen JH, Prins JM. Penetration of atazanavir in seminal plasma of men infected with human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2007,**51**:335-337.
46. Le Tortorec A, Le Grand R, Denis H, Satie AP, Mannioui K, Roques P, *et al.* Infection of semen-producing organs by SIV during the acute and chronic stages of the disease. *PLoS One* 2008,**3**:e1792.
47. Roulet V, Satie AP, Ruffault A, Le Tortorec A, Denis H, Guist'hau O, *et al.* Susceptibility of human testis to human immunodeficiency virus-1 infection in situ and in vitro. *Am J Pathol* 2006,**169**:2094-2103.
48. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, *et al.* Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999,**5**:512-517.
49. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 2003,**9**:727-728.
50. Chun TW, Justement JS, Moir S, Hallahan CW, Maenza J, Mullins JI, *et al.* Decay of the HIV reservoir in patients receiving antiretroviral therapy for extended periods: implications for eradication of virus. *J Infect Dis* 2007,**195**:1762-1764.
51. Lewin SR, Rouzioux C. HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials? *AIDS* 2011,**25**:885-897.
52. Archin NM, Espeseth A, Parker D, Cheema M, Hazuda D, Margolis DM. Expression of latent HIV induced by the potent HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009,**25**:207-212.
53. Contreras X, Schweneker M, Chen CS, McCune JM, Deeks SG, Martin J, *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid reactivates HIV from latently infected cells. *J Biol Chem* 2009,**284**:6782-6789.

54. Choi BS, Lee HS, Oh YT, Hyun YL, Ro S, Kim SS, *et al.* Novel histone deacetylase inhibitors CG05 and CG06 effectively reactivate latently infected HIV-1. *AIDS* 2010,**24**:609-611.
55. Shehu-Xhilaga M, Rhodes D, Wightman F, Liu HB, Solomon A, Saleh S, *et al.* The novel histone deacetylase inhibitors metacept-1 and metacept-3 potently increase HIV-1 transcription in latently infected cells. *AIDS* 2009,**23**:2047-2050.
56. Archin NM, Keedy KS, Espeseth A, Dang H, Hazuda DJ, Margolis DM. Expression of latent human immunodeficiency type 1 is induced by novel and selective histone deacetylase inhibitors. *AIDS* 2009,**23**:1799-1806.
57. Victoriano AF, Imai K, Togami H, Ueno T, Asamitsu K, Suzuki T, *et al.* Novel histone deacetylase inhibitor NCH-51 activates latent HIV-1 gene expression. *FEBS Lett* 2011,**585**:1103-1111.
58. Wightman F, Ellenberg P, Churchill M, Lewin SR. HDAC inhibitors in HIV. In: *Immunol Cell Biol*; 2011.
59. Fernandez G, Zeichner SL. Cell line-dependent variability in HIV activation employing DNMT inhibitors. *Virol J* 2010,**7**:266.
60. Kulkosky J, Culnan DM, Roman J, Dornadula G, Schnell M, Boyd MR, *et al.* Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood* 2001,**98**:3006-3015.
61. Burnett JC, Lim KI, Calafi A, Rossi JJ, Schaffer DV, Arkin AP. Combinatorial latency reactivation for HIV-1 subtypes and variants. *J Virol* 2010,**84**:5958-5974.
62. Reuse S, Calao M, Kabeya K, Guiguen A, Gatot JS, Quivy V, *et al.* Synergistic activation of HIV-1 expression by deacetylase inhibitors and prostratin: implications for treatment of latent infection. *PLoS One* 2009,**4**:e6093.
63. Mehla R, Bivalkar-Mehla S, Zhang R, Handy I, Albrecht H, Giri S, *et al.* Bryostatins modulates latent HIV-1 infection via PKC and AMPK signaling but inhibits acute infection in a receptor independent manner. *PLoS One* 2010,**5**:e11160.
64. López-Huertas MR, Mateos E, Díaz-Gil G, Gómez-Esquer F, Sánchez del Cojo M, Alcamí J, *et al.* Protein kinase C θ is a specific target for inhibition of the HIV type 1 replication in CD4⁺ T lymphocytes. *J Biol Chem* 2011,**286**:27363-27377.
65. Vandergeeten C, Fromentin R, Chomont N. The role of cytokines in the establishment, persistence and eradication of the HIV reservoir. *Cytokine Growth Factor Rev* 2012,**23**:143-149.

66. Wang FX, Xu Y, Sullivan J, Souder E, Argyris EG, Acheampong EA, *et al.* IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART. *J Clin Invest* 2005,**115**:128-137.
67. Levy Y, Lacabaratz C, Weiss L, Viard JP, Goujard C, Lelièvre JD, *et al.* Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J Clin Invest* 2009,**119**:997-1007.
68. Vandergeeten C, Da Fonseca S, Sereti I. Differential impact of IL-7 and IL-15 on HIV Reservoir Persistence. In: *6th IAS Conference on HIV pathogenesis*. Rome, Italy; 2011.
69. Rosenblatt J, Glotzbecker B, Mills H, Vasir B, Tzachanis D, Levine JD, *et al.* PD-1 blockade by CT-011, anti-PD-1 antibody, enhances ex vivo T-cell responses to autologous dendritic cell/myeloma fusion vaccine. *J Immunother* 2011,**34**:409-418.
70. Szeto GL, Brice AK, Yang HC, Barber SA, Siliciano RF, Clements JE. Minocycline attenuates HIV infection and reactivation by suppressing cellular activation in human CD4+ T cells. *J Infect Dis* 2010,**201**:1132-1140.
71. Hooper L, Wong M, Thelin A, Hansson L, Falk P, Gordon J. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001,**291**:881-884.
72. Guihot A, Bourgarit A, Carcelain G, Autran B. Immune reconstitution after a decade of combined antiretroviral therapies for human immunodeficiency virus. *Trends Immunol* 2011,**32**:131-137.
73. Robbins GK, Spritzler JG, Chan ES, Asmuth DM, Gandhi RT, Rodriguez BA, *et al.* Incomplete reconstitution of T cell subsets on combination antiretroviral therapy in the AIDS Clinical Trials Group protocol 384. *Clin Infect Dis* 2009,**48**:350-361.
74. Piketty C, Darragh T, Heard I, Da Costa M, Bruneval P, Kazatchkine M, *et al.* High prevalence of anal squamous intraepithelial lesions in HIV-positive men despite the use of highly active antiretroviral therapy. *Sex Transm Dis* 2004,**31**:96-99.
75. Gutierrez F, Padilla S, Masia M, Iribarren JA, Moreno S, Viciano P, *et al.* Patients' characteristics and clinical implications of suboptimal CD4 T-cell gains after 1 year of successful antiretroviral therapy. *Curr HIV Res* 2008,**6**:100-107.
76. Gazzola L, Tincati C, Bellistri GM, Monforte A, Marchetti G. The absence of CD4+ T cell count recovery despite receipt of virologically suppressive highly active antiretroviral therapy: clinical risk, immunological gaps, and therapeutic options. *Clin Infect Dis* 2009,**48**:328-337.

77. Lange CG, Valdez H, Medvik K, Asaad R, Lederman MM. CD4+ T-lymphocyte nadir and the effect of highly active antiretroviral therapy on phenotypic and functional immune restoration in HIV-1 infection. *Clin Immunol* 2002,**102**:154-161.
78. Haas DW, Geraghty DE, Andersen J, Mar J, Moutsinger AA, D'Aquila RT, *et al.* Immunogenetics of CD4 lymphocyte count recovery during antiretroviral therapy: An AIDS Clinical Trials Group study. *J Infect Dis* 2006,**194**:1098-1107.
79. Camargo JF, Kulkarni H, Agan BK, Gaitan AA, Beachy LA, Srinivas S, *et al.* Responsiveness of T cells to interleukin-7 is associated with higher CD4+ T cell counts in HIV-1-positive individuals with highly active antiretroviral therapy-induced viral load suppression. *J Infect Dis* 2009,**199**:1872-1882.
80. Bellistri GM, Casabianca A, Merlini E, Orlandi C, Ferrario G, Meroni L, *et al.* Increased bone marrow interleukin-7 (IL-7)/IL-7R levels but reduced IL-7 responsiveness in HIV-positive patients lacking CD4+ gain on antiviral therapy. *PLoS One* 2010,**5**:e15663.
81. Pitrak DL, Bolaños J, Hershow R, Novak RM. Discordant CD4 T lymphocyte responses to antiretroviral therapy for HIV infection are associated with ex-vivo rates of apoptosis. *AIDS* 2001,**15**:1317-1319.
82. Chun TW, Justement JS, Pandya P, Hallahan CW, McLaughlin M, Liu S, *et al.* Relationship between the size of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reservoir in peripheral blood CD4+ T cells and CD4+:CD8+ T cell ratios in aviremic HIV-1-infected individuals receiving long-term highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2002,**185**:1672-1676.
83. Paiardini M, Frank I, Pandrea I, Apetrei C, Silvestri G. Mucosal immune dysfunction in AIDS pathogenesis. *AIDS Rev* 2008,**10**:36-46.
84. Maria BG, Valentina P, Camilla T, Luca M, Andrea G, Antonella dAM, *et al.* Microbial Translocation Is a Determinant of Persisting T Cell Hyperactivation in HIV-infected Patients Failing to Recover CD4 following Long-term HAART. In: *15th CROI*. Boston, MA; 2008.
85. Sooda DL, Silvestri G. Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS* 2008,**22**:439-446.
86. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than

- CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997,**16**:83-92.
87. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* 2008,**214**:231-241.
88. Piketty C, Castiel P, Belec L, Batisse D, Si Mohamed A, Gilquin J, *et al.* Discrepant responses to triple combination antiretroviral therapy in advanced HIV disease. *Aids* 1998,**12**:745-750.
89. Autran B, Carcelaint G, Li TS, Gorochov G, Blanc C, Renaud M, *et al.* Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy. *Immunol Lett* 1999,**66**:207-211.
90. Li TS, Tubiana R, Katlama C, Calvez V, Ait Mohand H, Autran B. Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet* 1998,**351**:1682-1686.
91. Valdez H, Connick E, Smith KY, Lederman MM, Bosch RJ, Kim RS, *et al.* Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. *AIDS* 2002,**16**:1859-1866.
92. Dragsted UB, Mocroft A, Vella S, Viard JP, Hansen AB, Panos G, *et al.* Predictors of immunological failure after initial response to highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected adults: a EuroSIDA study. *J Infect Dis* 2004,**190**:148-155.
93. Kaufmann GR, Furrer H, Ledergerber B, Perrin L, Opravil M, Vernazza P, *et al.* Characteristics, determinants, and clinical relevance of CD4 T cell recovery to <500 cells/microL in HIV type 1-infected individuals receiving potent antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2005,**41**:361-372.
94. D'Amico R, Yang Y, Mildvan D, Evans SR, Schnizlein-Bick CT, Hafner R, *et al.* Lower CD4+ T lymphocyte nadirs may indicate limited immune reconstitution in HIV-1 infected individuals on potent antiretroviral therapy: analysis of immunophenotypic marker results of AACTG 5067. *J Clin Immunol* 2005,**25**:106-115.
95. Marchetti G, Bellistri GM, Borghi E, Tincati C, Ferramosca S, La Francesca M, *et al.* Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4+ T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2008,**22**:2035-2038.
96. Gori A, Tincati C, Rizzardini G, Torti C, Quirino T, Haarman M, *et al.* Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of

- gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis. *J Clin Microbiol* 2008,**46**:757-758.
97. Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* 2001,**6**:733-742.
 98. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003,**21**:335-376.
 99. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004,**16**:3-9.
 100. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005,**17**:1-14.
 101. Lester RT, Yao XD, Ball TB, McKinnon LR, Omange WR, Kaul R, *et al.* HIV-1 RNA dysregulates the natural TLR response to subclinical endotoxemia in Kenyan female sex-workers. *PLoS ONE* 2009,**4**:e5644.
 102. Meier A, Bagchi A, Sidhu HK, Alter G, Suscovich TJ, Kavanagh DG, *et al.* Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands. *Aids* 2008,**22**:655-658.
 103. Meier A, Chang JJ, Chan ES, Pollard RB, Sidhu HK, Kulkarni S, *et al.* Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nat Med* 2009,**15**:955-959.
 104. Nowroozalizadeh S, Mansson F, da Silva Z, Repits J, Dabo B, Pereira C, *et al.* Studies on toll-like receptor stimuli responsiveness in HIV-1 and HIV-2 infections. *Cytokine* 2009,**46**:325-331.
 105. Thibault S, Fromentin R, Tardif MR, Tremblay MJ. TLR2 and TLR4 triggering exerts contrasting effects with regard to HIV-1 infection of human dendritic cells and subsequent virus transfer to CD4+ T cells. *Retrovirology* 2009,**6**:42.
 106. Marchetti G, Cozzi-Lepri A, Bellistri GM, Merlini E, Chiodera A, Soscia F, *et al.* Role of Microbial Translocation and Immune Hyperactivation in Disease Progression of HIV+ Patients with Preserved CD4 Count in the Absence of ART. In: *CROI*. 17th ed. San Francisco; 2010.
 107. Pinzone MR, Di Rosa M, Cacopardo B, Nunnari G. HIV RNA suppression and immune restoration: can we do better? *Clin Dev Immunol* 2012,**2012**:515962.
 108. Hatano H, Jain V, Hunt PW, Lee TH, Sinclair E, Do TD, *et al.* Cell-Based Measures of Viral Persistence Are Associated With Immune Activation and Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1)-Expressing CD4+ T cells. *J Infect Dis* 2012.
 109. Smith MZ, Wightman F, Lewin SR. HIV reservoirs and strategies for eradication. *Curr HIV/AIDS Rep* 2012,**9**:5-15.

110. Huang CB, Alimova YV, Ebersole JL. HIV-1 reactivation in HIV-latently infected dendritic cells by oral microorganisms and LPS. *Cell Immunol* 2011,**268**:105-111.
111. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994,**32**:335-351.
112. Cassol E, Malfeld S, Mahasha P, van der Merwe S, Cassol S, Seebregts C, *et al.* Persistent microbial translocation and immune activation in HIV-1-infected South Africans receiving combination antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2010,**202**:723-733.
113. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, *et al.* Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis* 2009,**199**:1177-1185.
114. Perdigón G, Vintiñi E, Alvarez S, Medina M, Medici M. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1999,**82**:1108-1114.
115. Equils O, Salehi KK, Cornataeanu R, Lu D, Singh S, Whittaker K, *et al.* Repeated lipopolysaccharide (LPS) exposure inhibits HIV replication in primary human macrophages. *Microbes Infect* 2006,**8**:2469-2476.
116. Shao L, Sperber K. Impaired regulation of HLA-DR expression in human immunodeficiency virus-infected monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002,**9**:739-746.
117. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 2003,**21**:265-304.
118. Egger M, May M, Chêne G, Phillips AN, Ledergerber B, Dabis F, *et al.* Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet* 2002,**360**:119-129.
119. Boulassel MR, Chomont N, Pai NP, Gilmore N, Sékaly RP, Routy JP. CD4 T cell nadir independently predicts the magnitude of the HIV reservoir after prolonged suppressive antiretroviral therapy. *J Clin Virol* 2012,**53**:29-32.
120. Lewin SR, Evans VA, Elliott JH, Spire B, Chomont N. Finding a cure for HIV: will it ever be achievable? *J Int AIDS Soc* 2011,**14**:4.
121. Chahroudi A, Silvestri G. Interleukin-7 in HIV pathogenesis and therapy. *Eur Cytokine Netw* 2010,**21**:202-207.

122. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007,**7**:179-190.

Figure e Tabelle

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti in studio

	PIRs (n=29)	INRs (n= 15)	HIV neg (n=13)	p
Età, anni (IQR)*	40 (32-48)	36 (29-52)	27 (25-32)	.002
Sesso (M) (%)°	21 (72)	13 (87)	2	.001
Fattori di rischio (%) °				
<i>Eterosex</i>	15 (52)	9 (60)		
<i>Omosex</i>	7 (24)	2 (13)		
<i>TD</i>	3 (10)	1 (7)	N/A	
<i>Altro</i>	4 (14)	3 (20)		
Durata infezione, anni (IQR)*	4 (2-6)	6 (1-7)	N/A	
Durata HAART, mesi (IQR)*	30 (15-59)	28 (12-64)	N/A	
HCV-Ab, si (%)°	3 (10)	2 (13)	N/A	
Diagnosi di AIDS, si (%)°	14 (48)	9 (60)	N/A	
Conta CD4 (cell/mmc) (IQR)*				
<i>Nadir</i>	70 ^{a,b} (40-140)	35 ^b (13-56)	N/A	
<i>T12 HAART</i>	330 ^a (281- 399)	166 (127- 189)		
HIV-1 RNA Log(cp/mL) (IQR)*				
<i>Zenith</i>	5,17 ^b (4,81 - 5,69)	4,78 ^b (4,16 - 5,16)	N/A	
<i>T12 HAART</i>	1,7 (1,70 - 1,78)	1,7 (1,70 - 1,78)		
Tipo di HAART (%)°:				
<i>NRTI+PI</i>	28 (97)	15 (100)	N/A	
<i>NRTI+NNRTI</i>	1 (3)	0		
Traslocazione Microbica*				
sCD14 (µg/mL) (IQR)				
<i>T0</i>	3,18 (2,7 – 4,5)	3,07 (2,8 – 3,9)	1,96 (1,39 – 2,4)	.002
<i>T12</i>	4,26 (2,5 – 8,5)	3,85 (2,8 – 11,6)		.001
LPS(pg/mL) (IQR)				
<i>T0</i>	75 (52 – 82)	75 (51 – 85)	75 (75 – 79,41)	.567
<i>T12</i>	75 (62 – 81)	75 (65– 114)		.947

NOTE: * I dati sono presentati come mediane e range interquartili (IQR), analisi statistiche Kruskal-Wallis e Mann-Whitney; ° i dati sono presentati come numeri assoluti e percentuali, analisi statistiche Chi-quadro e test esatto di Fisher. PIR, *Partial Immunological Responders* (CD4 \geq 250/mmc; HIV-RNA<60cp/mL); INR, *Immunological Non Responders* (CD4<200/mmc; HIV-RNA<60cp/mL); TD, tossico-dipendenti; HAART, terapia antiretrovirale ad alta efficacia; NRTI, inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa; NNRTI, inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa; PI, inibitori della proteasi. ^ap<.01 per PIR vs INR; ^bp<.01 per T0 vs T12.

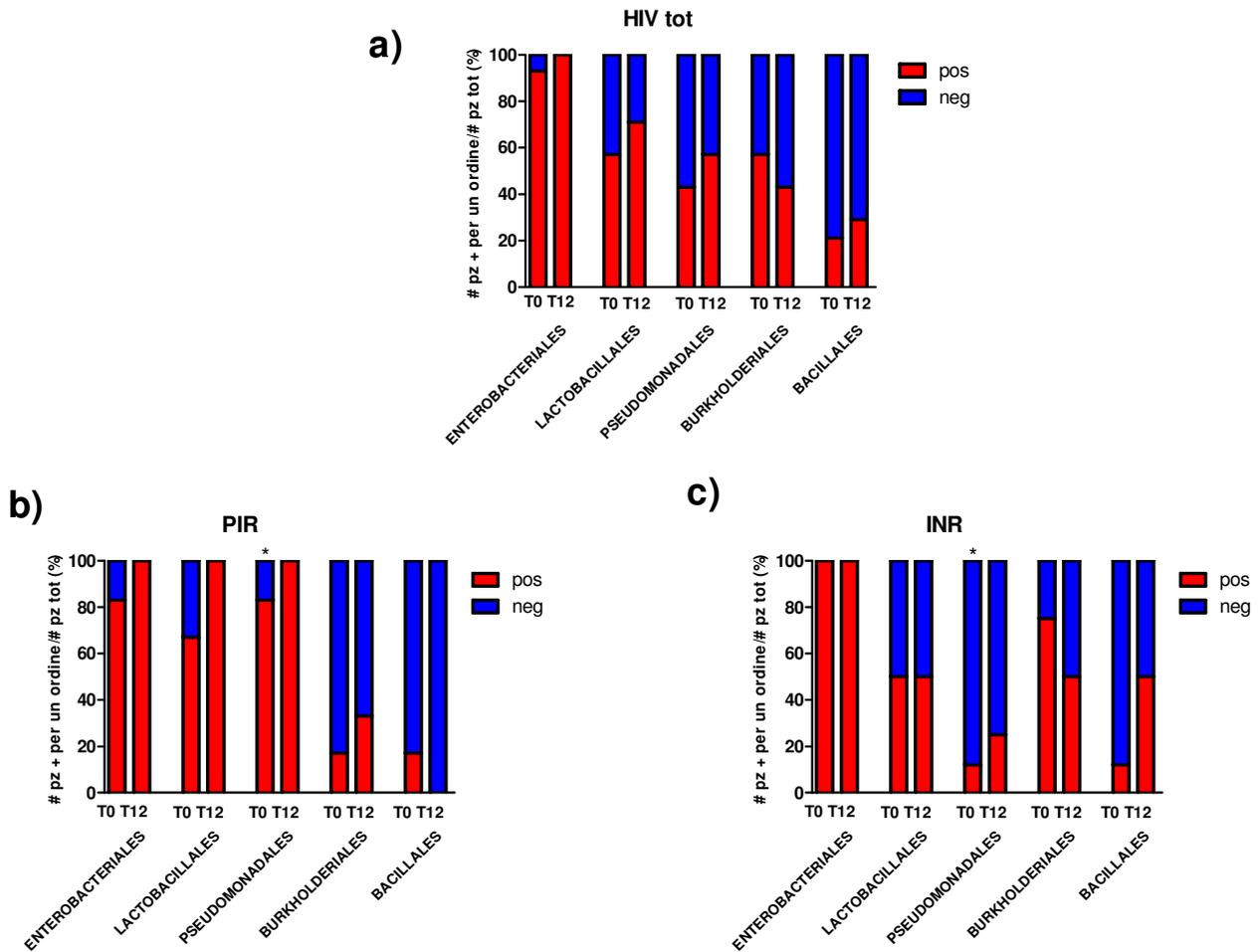


Figura 1. Ordini batterici nei pazienti HIV positivi.

a) Il sequenziamento delle colonie ha rivelato per ogni paziente HIV+ una flora traslocante appartenente a diversi ordini batterici, senza alcuna variazione nella composizione tra T0 e T12. In particolare, è rimasta costante la proporzione di batteri appartenenti all'ordine, Lactobacillales, Pseudomonadales, Burkholderiales e Bacillales. **b-c)** Dividendo gli HIV-positivi in PIR e INR, abbiamo visto che i due gruppi mostravano una proporzione simile di Enterobacteriales, Lactobacillales, Burkholderiales e Bacillales. In modo interessante, una maggior proporzione di PIR presenta batteri appartenenti all'ordine Pseudomonadales ($p=.026$). Nessun cambiamento significativo nella composizione batterica dopo introduzione della terapia è stato riscontrato nei due gruppi in studio.

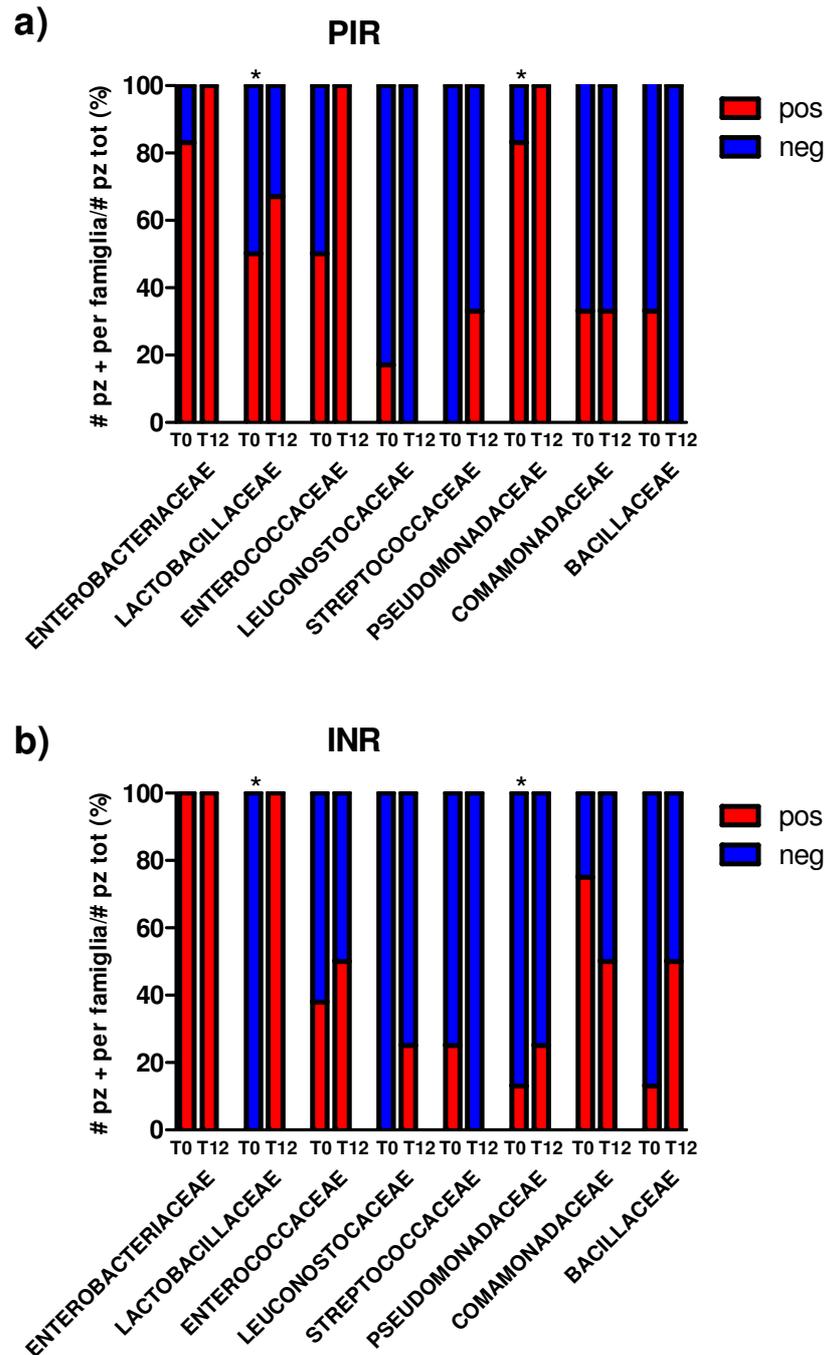


Figura 2. Famiglie batteriche nei pazienti HIV positivi con diversa risposta immunologica alla HAART.

Confrontati con gli INR, al T0 i PIR mostravano una maggior proporzione di Lactobacillaceae ($p=.05$) e Pseudomonadaceae ($p=.026$). Dopo 12 mesi di HAART, entrambi i gruppi in studio non mostrano significative variazioni.

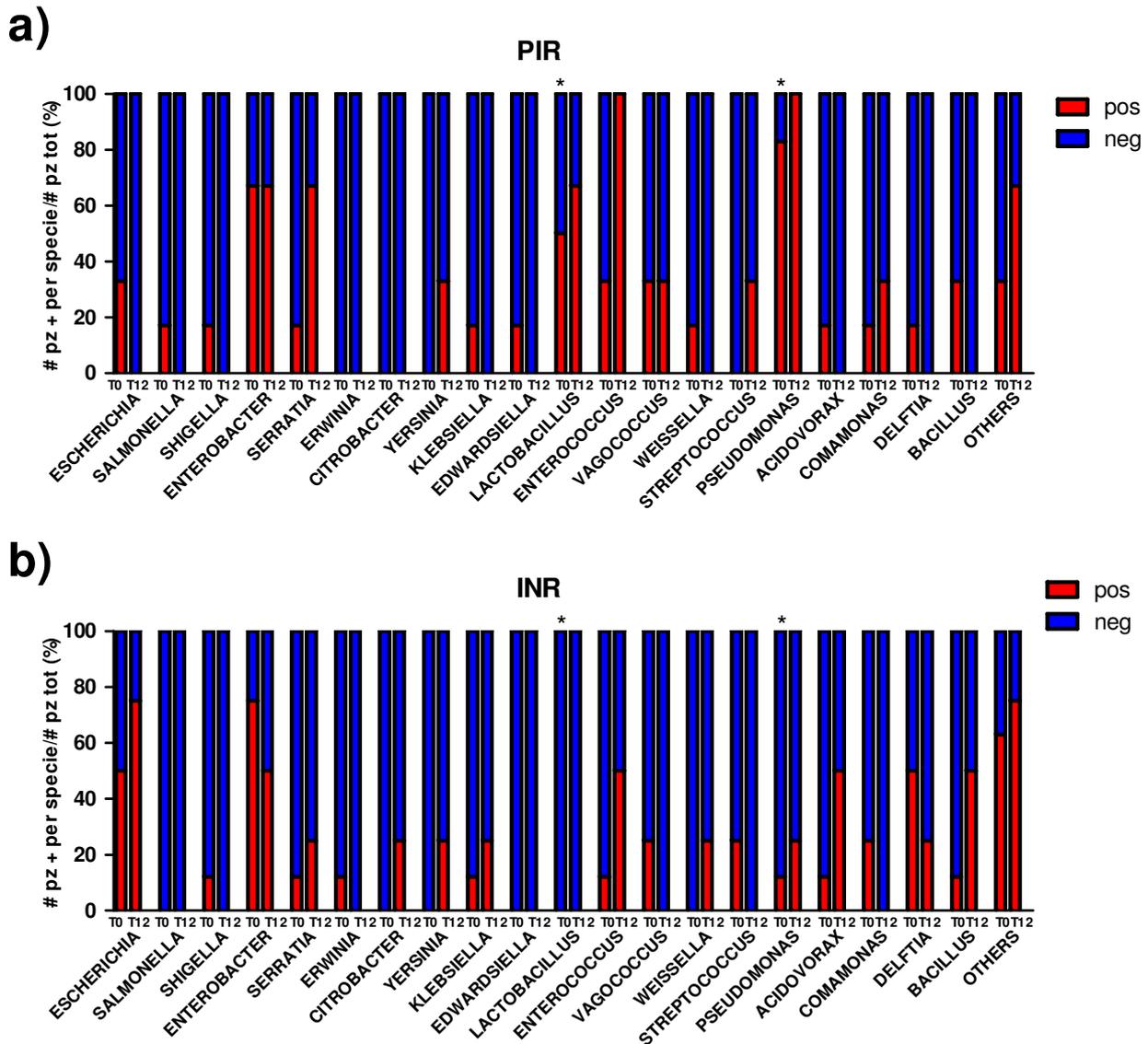


Figura 3. Generi/specie batterici nei pazienti HIV positivi con diversa risposta immunologica alla HAART.

Confrontati con gli INR, al T0 i PIR mostravano una maggior proporzione di *Lactobacillus* sp ($p=.05$) e *Pseudomonas* sp ($p=.026$). Dopo 12 mesi di HAART, entrambi i gruppi in studio non mostrano significative variazioni.

Tabella 2. Caratteristiche dei pazienti in studio

	HIV+ TOTALI n=23	HC n=11	LC n=12	p
Età, anni *(IQR)	34 (30-39)	37 (34-41)	33 (29-37)	0.164
Sesso (%) [°] F	3(13)	1(9)	2 (8)	1.000
Fattori di rischio [°] (%) omo/bisex eterosex TD	17 (73) 6(27) 0	8 (73) 3(27) 0	9 (75) 3 (25) 0	1.000
Durata infezione HIV, anni *(IQR)	2 (2-4)	2 (2-4)	2 (2-4.5)	0.978
Diagnosi di AIDS [°] (%) (si)	2 (9)	1 (9)	1 (8)	1.000
Co-infezione HCV [°] (%) si	2 (9)	0	2 (17)	0.481
CD4 T-cell/mmc* (IQR) al momento dell'analisi	472 (394-587)	587 (552-651)	403 (301-447)	0.0001
HIV-RNA, log ₁₀ cp/mL* (IQR) al momento dell'analisi	4.5 (3.7-5.2)	4.6 (3.3-5.2)	4.3 (3.6-5.2)	0.623

NOTE: * I dati sono presentati come mediane e range interquartili (IQR), analisi statistiche Kruskal-Wallis e Mann-Whitney; [°] i dati sono presentati come numeri assoluti e percentuali, analisi statistiche Chi-quadrato e test esatto di Fisher. HC, *High CD4 Count* (CD4 \geq 500/mmc); LC, *Low CD Count* (CD4<500/mmc); TD, tossico-dipendenti.

Tabella 3. Caratteristiche dei pazienti in studio

	HIV+ TOTALI (n=35)	FR (n=20)	INR (n=15)	p
Età, anni (IQR)*	48 (41-63)	51 (41-68)	45 (39-54)	0.278
Sesso, (%)° F	7 (20)	6 (30)	1 (7)	0.198
Fattori di rischio, (%)° Eterosex	18 (51)	11 (55)	7 (47)	0.271
Omosex/Bisex	11 (31)	6 (30)	5 (33)	
TD	6 (18)	3 (15)	3 (20)	
Co-infezione HCV, (%)° Si	5 (14)	3 (15)	2 (13)	0.722
Diagnosi di AIDS° (%), (si)	14 (40)	5 (25)	9 (60)	0.079
Durata infezione HIV, anni (IQR)*	5 (4-7)	5 (5-7)	5 (3-7)	0.552
Conta CD4/mmc (IQR)* Nadir	94 (26-217)	97 (42-230)	94 (26-124)	0.342
Al tempo dell'analisi	372 (253-455)	451 (404-585)	237 (164-299)	<0.0001
HIV-RNA Log cp/mL (IQR)* al tempo dell'analisi	1.59 (1.59-1.59)	1.59 (1.59-1.59)	1.59 (1.59-1.59)	0.901
Durata HAART, anni (IQR)*	5 (3-6)	4.5 (3-5)	5 (3-6)	0.444
Tipo di HAART (%)° NRTI+PI	24 (68.5)	11 (55)	13 (86)	0.112
NRTI+NNRTI	8 (23)	7 (35)	1 (7)	
Altro	3 (8.5)	2 (10)	1 (7)	
Livelli plasmatici di LPS (pg/mL)	203 (83,3-257,8)	164 (75-264)	235 (108-265)	.447

NOTE: * I dati sono presentati come mediane e range interquartili (IQR), analisi statistiche Kruskal-Wallis e Mann-Whitney; ° i dati sono presentati come numeri assoluti e percentuali, analisi statistiche Chi-quadro e test esatto di Fisher. FR, *Full Responders* (CD4 \geq 350/mmc; HIV-RNA<40cp/mL); INR, *Immunological Non Responders* (CD4<350/mmc; HIV-RNA<40cp/mL); TD, tossico-dipendenti; HAART, terapia antiretrovirale ad alta efficacia; NRTI, inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa; NNRTI, inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa; PI, inibitori della proteasi; LPS, Lipopolisaccaride.

Tabella 4. Attivazione T-cellulare nei pazienti naive alla HAART

HLA-DR+CD4, % (IQR)													
	UNST	LPS	p	LTA	p	PGN	p	ssRNA	p	IFN	p	CD3/28	p
HIV-	33.1 (17.1-44.4)	33.4 (19.1-38.9)	0.831	35.4 (18.2-39.3)	0.229	34.1 (17.1-47)	0.669	29.1 (17.9-38.7)	0.687	22.3 (18.8-41.6)	0.813	50.3 (43-78.2)	0.031
HC	22.1 (20.7-33.9)	25.9 (18.3-35.1)	0.831	31.7 (17.1-37)	0.175	28.8 (22.1-37.2)	0.065	35.5 (22.5-46.8)	0.113	30.2 (29.3-41.9)	0.313	49.3 (39.5-53.2)	0.063
LC	51.5 (34.5-69.5)	47.5 (39.5-60.5)	0.638	47.3 (35.9-70.1)	0.564	46.7 (30.7-61.6)	0.413	58.5 (39.9-70.3)	1	57 (46.4-65.8)	0.813	58.5 (54.2-69.7)	0.469
p 3 groups	0.003	0.002		0.006		0.070		0.023		0.009		0.225	
HLA-DR+CD8, % (IQR)													
	UNST	LPS	p	LTA	p	PGN	p	ssRNA	p	IFN	p	CD3/28	p
HIV-	38.1 (18.1-61.5)	48.1 (25.1-62)	0.007	45.1 (24.8-71.2)	0.019	39 (19.4-69)	0.465	55 (26.1-62.2)	0.219	51.9 (25.3-74.2)	0.297	59.9 (52.3-80.1)	0.156
HC	49.4 (46.3-61.8)	51.5 (40-68.9)	0.831	53.6 (44.3-63.9)	1	63.5 (53.8-70)	0.042	63.7 (52.1-76.2)	0.103	65.1 (56.9-75.5)	0.438	60.2 (39.7-94.3)	0.439
LC	66.2 (51.1-73.8)	61.5 (53.1-61.5)	0.965	53.1 (39.8-53.1)	0.067	53.9 (52.1-74.4)	0.519	65.8 (52.2-82.2)	0.036	59.3 (48.6-81.7)	0.109	68.7 (55.9-92.1)	1
p 3 groups	0.015	0.180		0.492		0.156		0.169		0.488		0.401	
CD38+CD4, % (IQR)													
	UNST	LPS	p	LTA	p	PGN	p	ssRNA	p	IFN	p	CD3/28	p
HIV-	45.7 (39.3-54)	48.2 (44.4-57.9)	0.413	52.5 (47.3-63.1)	0.054	48.6 (41-58)	0.078	50.9 (38-65.8)	0.375	62.3 (47.8-68.7)	0.078	58.8(51.6-70.1)	0.031
HC	50.7 (34.4-57.1)	48.9 (32.5-58.6)	0.067	49.3 (30.3-51.8)	0.519	50.9 (38-65.8)	0.700	46.5 (32.1-65)	0.297	52.9 (44.6-59.5)	0.625	53.8 (49.1-57.6)	1
LC	36.3 (19.9-52.8)	47.1 (23.3-76.6)	0.148	48.7 (28-75.2)	0.206	46.5 (27.3-62.2)	0.148	71.1 (43.9-82.1)	0.031	61.4 (31.3-73.1)	0.375	53.8 (49.1-57.9)	0.313
p 3 groups	0.484	0.935		0.429		0.922		0.209		0.554		0.250	
CD38+CD8, % (IQR)													
	UNST	LPS	p	LTA	p	PGN	p	ssRNA	p	IFN	p	CD3/28	p
HIV-	19.6 (11.7-39.4)	18.5 (13.4-29.8)	0.206	25.7 (16.2-46)	0.465	27.4 (13.6-32.4)	0.966	39.1 (18.3-58.4)	0.219	36.8 (10.8-45.3)	0.038	45.1 (31.6-52.6)	0.297
HC	43.8 (34.5-61.9)	44.6 (35.5-90)	0.423	59.5 (47.2-93.4)	0.024	59.1 (41.9-97.9)	0.027	63.6 (47.6-33.2)	0.016	57.1 (44.3-63.6)	0.063	51.4 (46.4-57.3)	0.313
LC	37.9 (26.6-54.9)	43.2 (29.1-69.6)	0.148	39.9 (32.7-60.5)	0.638	53.5 (34.2-68.6)	0.206	68.3 (51.8-77.6)	0.063	59 (44.2-72.3)	0.219	77.3 (63.9-81.9)	0.047
p 3 groups	0.049	0.007		0.009		0.004		.048		0.020		0.002	

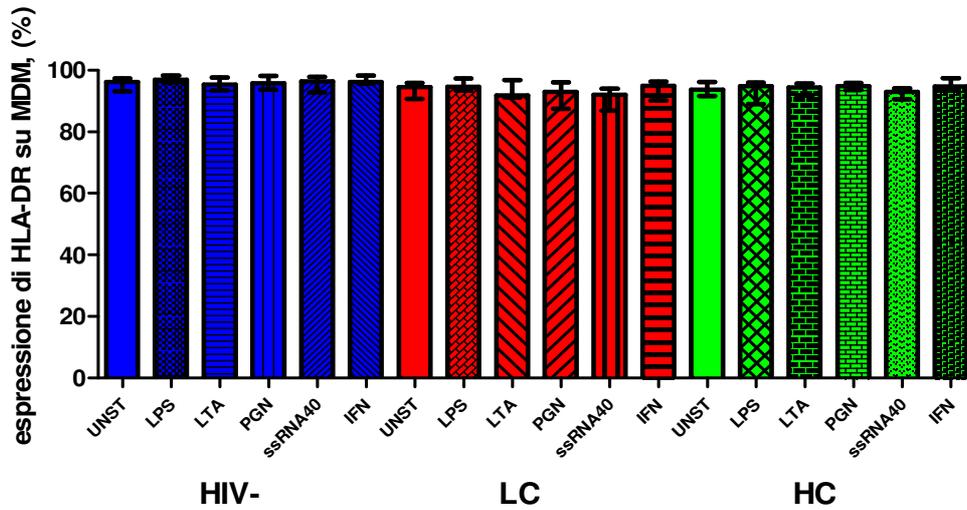
NOTE: I dati sono presentati come mediane e range interquartili (IQR), analisi statistiche Kruskal-Wallis e Wilcoxon test. HC, *High CD4 Count* ($CD4 \geq 500/mm^3$); LC, *Low CD Count* ($CD4 < 500/mm^3$). UNST, non stimolato; LPS, lipopolisaccaride; LTA, acido lipoteicoico; PGN, peptidoglicano; IFN, Interferone-gamma.

Tabella 5. Proliferazione e apoptosi T-cellulare nei pazienti naive alla HAART

Ki67+CD4, % (IQR)													
	UNST	LPS	p	LTA	p	PGN	p	ssRNA	p	IFN	p	CD3/28	p
HIV-	4.5 (2-9.7)	4.8 (1.6-8.6)	0.382	6.5 (1.5-10.1)	0.542	4.5 (3.1-6)	0.893	3.8 (1.3-16.3)	0.313	3.1 (1.3-16)	0.578	4.6 (1.6-8.5)	0.945
HC	5.5 (4.1-8.9)	5.3 (2.8-9)	0.275	5.3 (3.1-9.8)	0.275	4.4 (2.9-6.2)	0.570	5.5 (3.1-7.7)	1	6.2 (4.7-16.6)	0.625	12.7 (5.7-17.5)	0.250
LC	4.2 (0-10.3)	1.8 (0-13.2)	1	3.6 (0.4-16.2)	0.250	4.1 (1.6-12.7)	1	2.2 (1-5.2)	0.563	4.1 (0.7-15.5)	0.599	3.8 (0.5-6.5)	0.687
p 3 groups	0.241	0.457		0.821		0.979		0.252		0.446		0.113	
Ki67+CD8, % (IQR)													
	UNST	LPS	p	LTA	p	PGN	p	ssRNA	p	IFN	p	CD3/28	p
HIV-	3.9 (1.3-10.4)	5 (1.5-7.6)	0.685	7.3 (3.4-9.4)	0.094	4.9 (2.5-7.4)	0.969	4.1 (0.7-9.2)	0.641	1.7 (0.5-13.4)	0.813	3.7 (0.8-10.9)	0.799
HC	8.7 (6.6-15.6)	8.7 (3.3-15)	0.570	9 (3.3-18.8)	0.106	8.3 (3.7-17.9)	0.541	9.7 (4-12.3)	1	11.9 (7.3-18.6)	0.625	11.1 (5.9-15.6)	0.875
LC	7.7 (0.8-13.6)	10.7 (11.4-14.9)	0.923	11.8 (2.3-13.8)	0.894	10.7 (4.7-14.1)	0.557	3.9 (2.4-5.2)	0.290	8.6 (2.3-14.5)	0.844	5.3 (0-10.5)	0.438
p 3 groups	0.239	0.248		0.516		0.118		0.221		0.264		0.142	
Annex V+CD4, % (IQR)													
	UNST	LPS	p	LTA	p	PGN	p	ssRNA	p	IFN	p	CD3/28	p
HIV-	4.1 (1.2-14)	7.5 (2.3-20.2)	0.195	6.7 (1.4-17.1)	0.536	3.7 (1.8-7.5)	0.833	11.2 (5-22.6)	0.813	17.3 (6.4-30.2)	0.437	11.9 (6.6-41.2)	0.437
HC	2.6 (1.4-19.9)	6.8 (2.8-14.8)	0.831	6.6 (1.8-16.1)	0.322	6.3 (2.1-13.5)	0.846	13.1 (5.5-22.6)	1	26.2 (5-29.4)	0.813	25.5 (3.2-45.9)	0.813
LC	12.1 (4.5-23.6)	8.7 (2.8-17.7)	0.625	9.9 (2.5-20.8)	0.557	11.4 (2.6-30.8)	0.922	20.2 (3.3-39.8)	0.688	20.5 (8-28.2)	0.315	29.1 (12.1-40.9)	0.438
p 3 groups	0.224	0.919		0.874		0.260		0.740		0.179		0.902	
Annex V+CD8, % (IQR)													
	UNST	LPS	p	LTA	p	PGN	p	ssRNA	p	IFN	p	CD3/28	p
HIV-	13.7 (8.7-21.7)	9.9 (7.8-18.3)	0.640	16.8 (4.6-35.7)	0.687	14.5 (5.2-20.3)	0.640	19.9 (5.7-22.7)	0.625	19.4 (12.5-50.6)	0.187	7.6 (4.2-41.8)	0.625
HC	13.6 (8.1-26.9)	15.7 (6.1-23.5)	0.492	13.9 (7.1-28.5)	0.695	9.1 (5.7-16.6)	0.356	10.1 (5.8-26.1)	0.739	27.3 (6.6-34.3)	0.625	25.7 (1.9-43.8)	0.813
LC	14.1 (7.1-27.4)	26.7 (12.2-46.7)	0.049	19.7 (4.4-31.7)	0.846	15.4 (4.8-31.3)	0.432	15.7 (12.7-48.8)	0.687	16 (9.2-22.9)	0.813	13.3 (4.4-36.2)	0.578
p 3 groups	0.910	0.108		0.967		0.686		0.634		0.618		0.993	

NOTE: I dati sono presentati come mediane e range interquartili (IQR), analisi statistiche Kruskal-Wallis e Wilcoxon test. HC, *High CD4 Count* ($CD4 \geq 500/mm^3$); LC, *Low CD Count* ($CD4 < 500/mm^3$). UNST, non stimolato; LPS, lipopolisaccaride; LTA, acido lipoteicoico; PGN, peptidoglicano; IFN, Interferone-gamma.

a)



b)

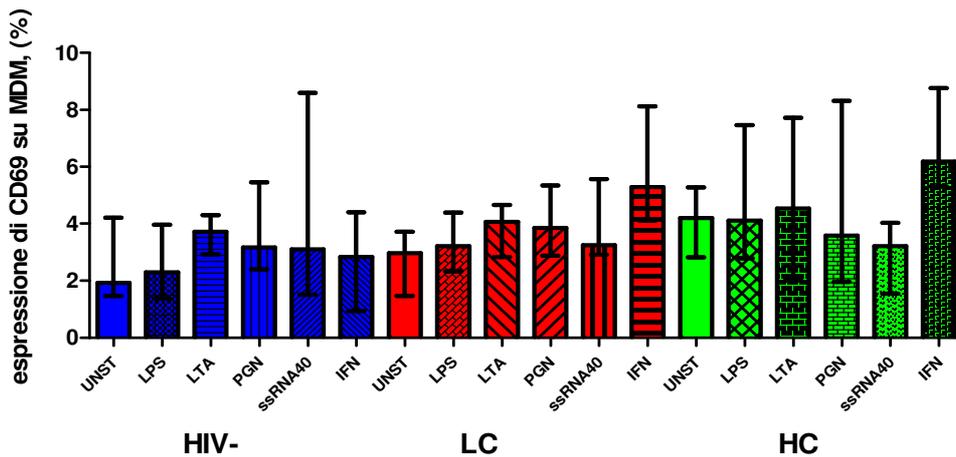


Figura 4. Effetti della stimolazione dei TLR sulla coltura di MDM di pazienti naive alla terapia antiretrovirale.

A conferma di quanto osservato per le cellule T, anche per i macrofagi la stimolazione dei TLR non si è tradotta in grandi cambiamenti dell'espressione del marcatore di funzionalità HLA-DR e del marcatore di attivazione CD69.

a) I soggetti HIV- mostravano livelli di espressione di HLA-DR più alti rispetto a HC ed LC, senza però risultare significativi da un punto di vista statistico. L'espressione di HLA-DR non è stata modificata dopo stimolazione, nè nel gruppo degli HIV-, nè in quello degli HC e degli LC. **b)** Nessuna differenza nell'espressione di CD69 è stata osservata tra i gruppi dopo stimolazione con i vari ligandi dei TLR.

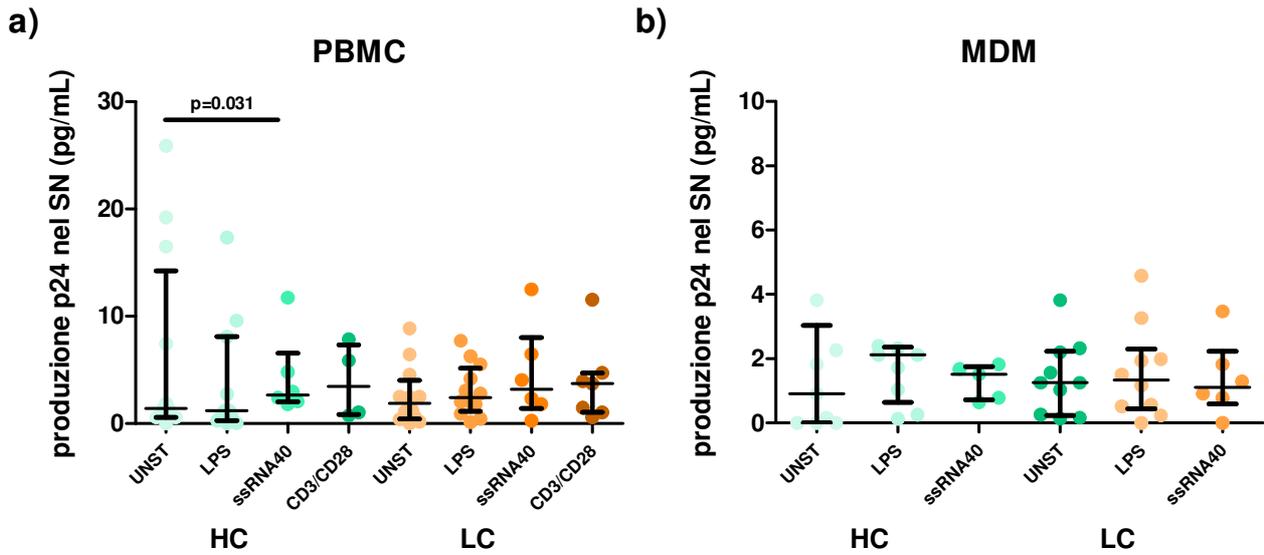


Figura 5. Effetti della stimolazione dei TLR sulla produzione di p24 da parte di PBMC eMDM di pazienti naive alla terapia antiretrovirale.

a) Sebbene HC e LC avessero una paragonabile produzione di p24 da parte dei PBMC, solo nel gruppo HC si è registrato un aumento della produzione virale dopo stimolazione con ssRNA ($p=0.031$). b) Nessuna differenza nella produzione di p24 da parte degli MDM è stata osservata nei due gruppi.

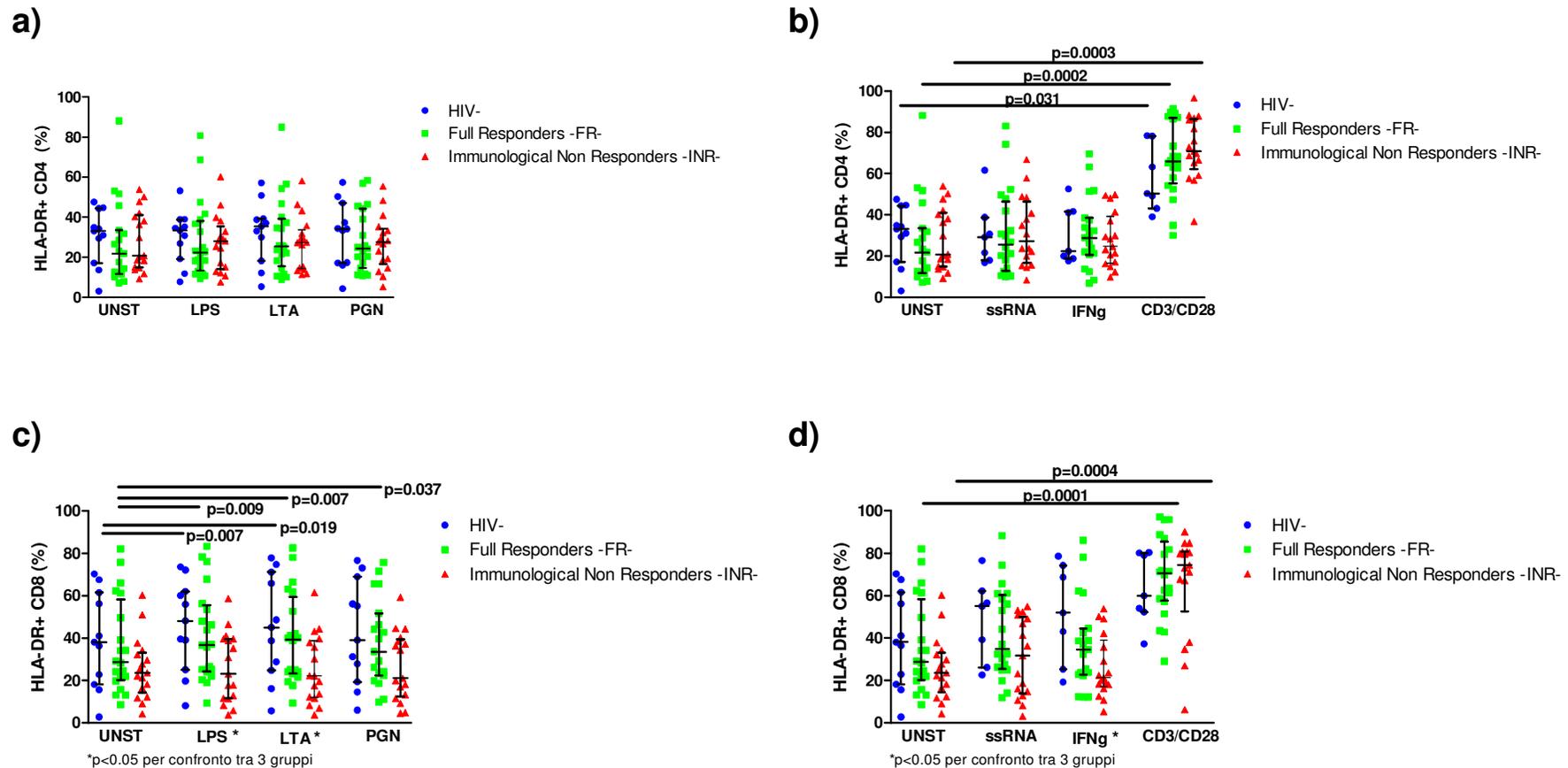


Figura 6. La stimolazione dei TLR determina una diversa espressione di HLA-DR sui linfociti T CD4 e CD8 in accordo al grado di immuno-ricostituzione in corso di HAART.

a-b) FR e INR hanno mostrato livelli simili di HLA-DR+CD4 dopo stimolazione dei TLR. Di conseguenza, confrontando i due gruppi con gli HIV- di controllo non abbiamo osservato alcuna differenza. **c-d)** Mentre nei FR abbiamo osservato un aumento di HLA-DR+CD8 dopo stimolazione con LPS ($p=.009$), LTA ($p=.007$), PGN ($p=.037$) e CD3/CD28 ($p=.0001$), negli INR c'è stato un aumento dell'attivazione solo dopo l'esposizione a CD3/CD28 ($p=.0004$). Dal confronto tra FR, INR e HIV- sono emerse differenze significative solo dopo stimolazione con LPS ($p=.027$), LTA ($p=.028$) e IFN γ ($p=.025$). In tutti i casi gli INR mostravano minore HLA-DR+CD8 rispetto ai FR (LPS: $p=.029$; LTA: $p=.023$; IFN γ : $p=.081$) e agli HIV- (LPS: $p=.019$; LTA: $p=.03$; IFN γ : $p=.013$).

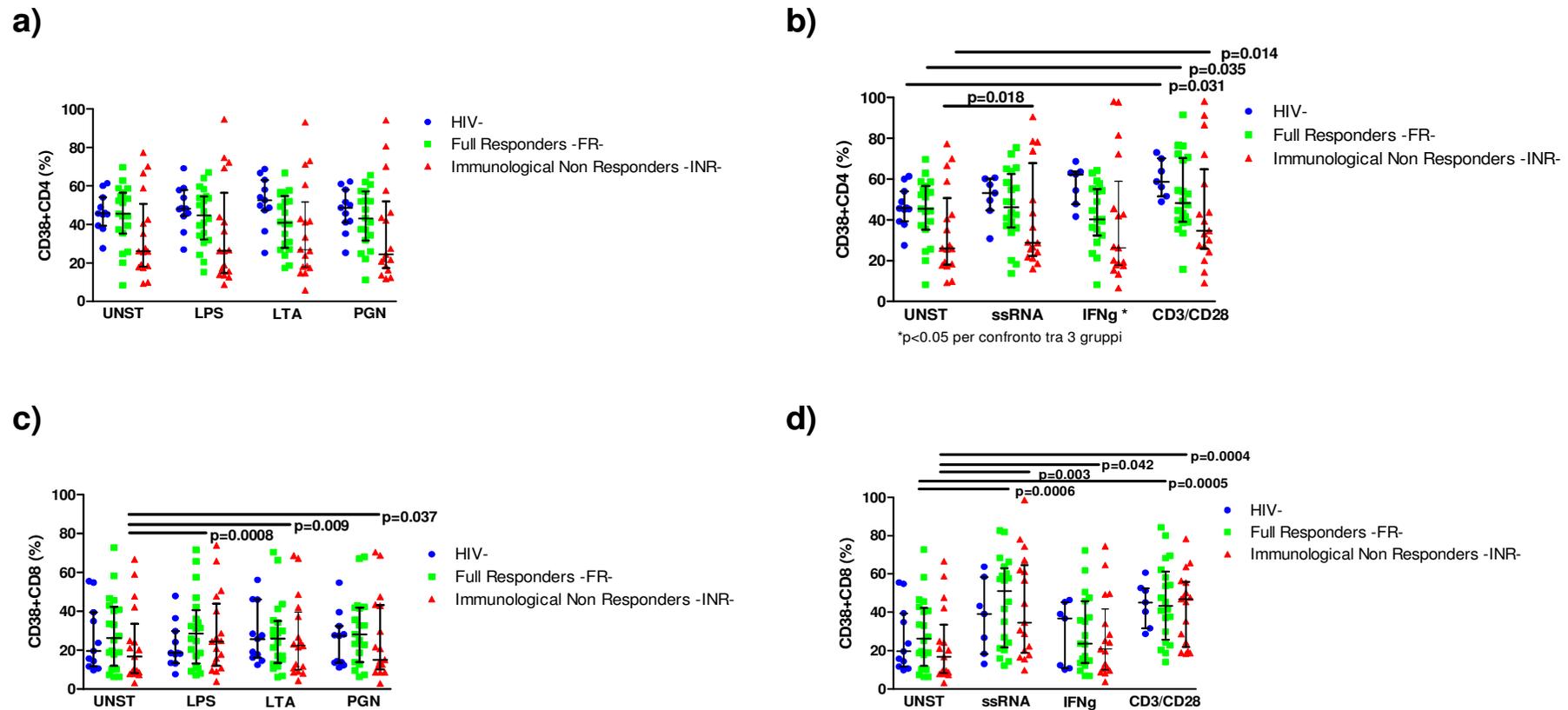


Figura 7. La stimolazione dei TLR determina una diversa espressione di CD38 sui linfociti T CD4 e CD8 in accordo al grado di immuno-ricostituzione in corso di HAART.

a-b) L'espressione del solo CD38 sui linfociti T CD4 è aumentata nel gruppo dei FR dopo esposizione a CD3/CD28 ($p=.035$), mentre nel gruppo degli INR solo dopo esposizione a ssRNA ($p=.018$). Nessuna differenza tra i 3 gruppi in studio è stata riscontrata ad eccezione della stimolazione con IFN γ ($p=.046$), per la quale gli HIV- hanno mostrato valori maggiori quando confrontati con FR ($p=.021$) e INR ($p=.075$). **c-d)** Per quanto concerne l'espressione di CD38 nel subset CD8, abbiamo osservato differenze significative nel gruppo dei FR dopo stimolazione con ssRNA ($p=.0006$) e CD3/CD28 ($p=.0005$). In modo interessante, il gruppo degli INR ha mostrato un aumento dell'attivazione dopo esposizione a pressoché tutti gli stimoli (LPS $p=.0008$; LTA $p=.009$; PGN $p=.037$; ssRNA $p=.0003$; IFN γ $p=.042$; CD3/CD28 $p=.0004$). Tuttavia, non abbiamo riscontrato alcuna differenza in CD38+CD8 confrontando HIV-, FR e INR.

Tabella 6. Proliferazione e apoptosi T-cellulare nei pazienti naive alla HAART

Ki67+CD4, % (IQR)													
	UNST	LPS	p	LTA	p	PGN	p	ssRNA	p	IFN	p	CD3/28	p
HIV-	4.5 (2-9.7)	4.8 (1.6-8.6)	0.382	6.5 (1.5-10.1)	0.542	4.5 (3.1-6)	0.893	3.8 (1.3-16.3)	0.313	3.1 (1.3-16)	0.578	4.6 (1.6-8.5)	0.945
FR	1.5 (0.8-3.4)	1.3 (0.2-2.3)	0.112	1.3 (0.6-2.9)	0.276	1.1 (0.4-1.9)	0.078	1.1 (0.5-2.5)	0.028	2.2 (0.6-2.5)	0.695	3.5 (1.8-5.1)	0.015
INR	2.7 (1.9-3.9)	1.4 (0.8-2.1)	0.002	1.4 (1-2.7)	0.028	1.3 (0.8-2.7)	0.080	1.4 (0.7-2.3)	0.424	1.8 (0.9-4.1)	1	5 (2.5-6.7)	0.069
p 3 gruppi	0.045	0.006		0.038		0.0002		0.096		0.364		0.395	
Ki67+CD8, % (IQR)													
	UNST	LPS	p	LTA	p	PGN	p	ssRNA	p	IFN	p	CD3/28	p
HIV-	3.9 (1.3-10.4)	5 (1.5-7.6)	0.685	7.3 (3.4-9.4)	0.094	4.9 (2.5-7.4)	0.969	4.1 (0.7-9.2)	0.641	1.7 (0.5-13.4)	0.813	3.7 (0.8-10.9)	0.799
FR	1.6 (0.9-2.7)	1.4 (0.3-2.5)	0.600	1.9 (0.9-3.1)	0.569	1.8 (0.1-3)	0.601	2.3 (1-2.7)	0.542	1.6 (0.8-4.2)	0.993	3.3 (2.1-5.2)	0.003
INR	2.5 (1.3-6.3)	2.3 (1.1-5.6)	0.443	1.9 (1.1-5.3)	0.019	3.3 (0.7-5.1)	0.514	3.1 (1.7-6.6)	0.604	2.9 (2.2-7.5)	0.599	6.1 (3.8-10.3)	0.003
p 3 gruppi	0.123	0.015		0.009		0.011		0.173		0.113		0.056	
Annex V+CD4, % (IQR)													
	UNST	LPS	p	LTA	p	PGN	p	ssRNA	p	IFN	p	CD3/28	p
HIV-	4.1 (1.2-14)	7.5 (2.3-20.2)	0.195	6.7 (1.4-17.1)	0.536	3.7 (1.8-7.5)	0.833	11.2 (5-22.6)	0.813	17.3 (6.4-30.2)	0.437	11.9 (6.6-41.2)	0.437
FR	7.1 (1.9-21.6)	4.9 (2.8-34)	0.557	8.1 (3.1-36.9)	0.923	12.7 (1.4-52.2)	0.203	3.3 (2.6-18.6)	0.547	8.3 (2.7-30.1)	1	17.9 (10.3-39.5)	0.065
INR	20.9 (8.6-36.9)	19.7 (8.5-45.1)	0.910	11 (5.6-43.2)	0.250	12.6 (8.2-48.1)	0.730	12 (6.7-27.5)	0.016	13.7 (7.7-46.2)	0.884	20.3 (15.9-49.4)	0.734
p 3 gruppi	0.039	0.186		0.579		0.079		0.195		0.587		0.668	
Annex V+CD8, % (IQR)													
	UNST	LPS	p	LTA	p	PGN	p	ssRNA	p	IFN	p	CD3/28	p
HIV-	13.7 (8.7-21.7)	9.9 (7.8-18.3)	0.640	16.8 (4.6-35.7)	0.687	14.5 (5.2-20.3)	0.640	19.9 (5.7-22.7)	0.625	19.4 (12.5-50.6)	0.187	7.6 (4.2-41.8)	0.625
FR	12.9 (5.1-20.5)	13.2 (7.5-17.6)	0.623	14.9 (8.1-19.5)	0.475	15.2 (4.7-21.2)	0.870	15.3 (8.9-18.3)	0.739	13.6 (4.7-19.7)	0.359	16.7 (11.3-30.9)	0.432
INR	11.7 (3.9-18.6)	13.4 (6.1-21.3)	0.652	13.9 (6.5-29.1)	0.097	15.9 (9.5-24.8)	0.039	11.8 (6.4-18.9)	0.578	17.4 (7.5-20.8)	0.742	18.6 (5.2-22.9)	0.164
p 3 gruppi	0.857	0.814		0.928		0.771		0.623		0.172		0.739	

NOTE: I dati sono presentati come mediane e range interquartili (IQR), analisi statistiche Kruskal-Wallis e Wilcoxon test. FR, *Full Responders* (CD4 \geq 350/mmc; HIV-RNA<40cp/mL); INR, *Immunological Non Responders* (CD4<350/mmc; HIV-RNA<40cp/mL). UNST, non stimolato; LPS, Lipopolisaccaride; LTA, acido lipoteicoico, PGN, peptidoglicano, IFN, interferone-gamma.

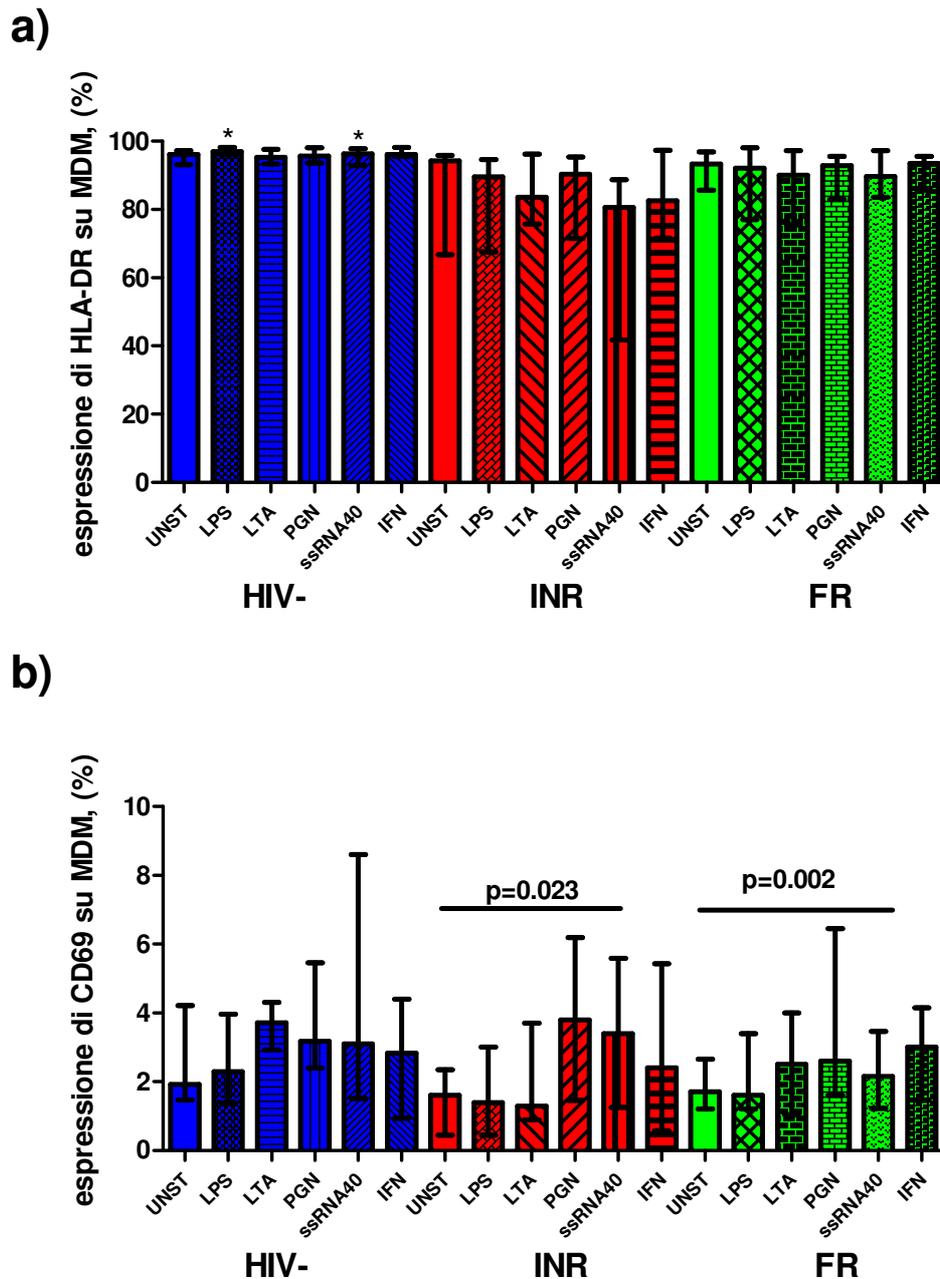


Figura 8. La stimolazione virale, ma non quella batterica determina una maggiore attivazione degli MDM in pazienti in corso di HAART con un diverso recupero immunitario.

a) I soggetti HIV- hanno mostrato livelli di espressione di HLA-DR più alti rispetto a quelli dei FR e INR, risultando significativi solo dopo stimolazione con LPS ($p=.016$) e ssRNA ($p=.018$). Valutando l'espressione di HLA-DR all'interno di uno stesso gruppo, non abbiamo osservato alcuna variazione dopo stimolazione dei TLR nè nel gruppo dei FR, nè in quello degli INR. **b)** Concentrandoci invece sull'attivazione degli MDM, non ci sono state differenze in CD69+CD14 confrontando tra loro HIV-, FR e INR. In modo interessante, solo lo stimolo ssRNA è stato in grado di aumentare l'espressione di CD69 sugli MDM nei FR ($p=.002$) e negli INR ($p=.023$).

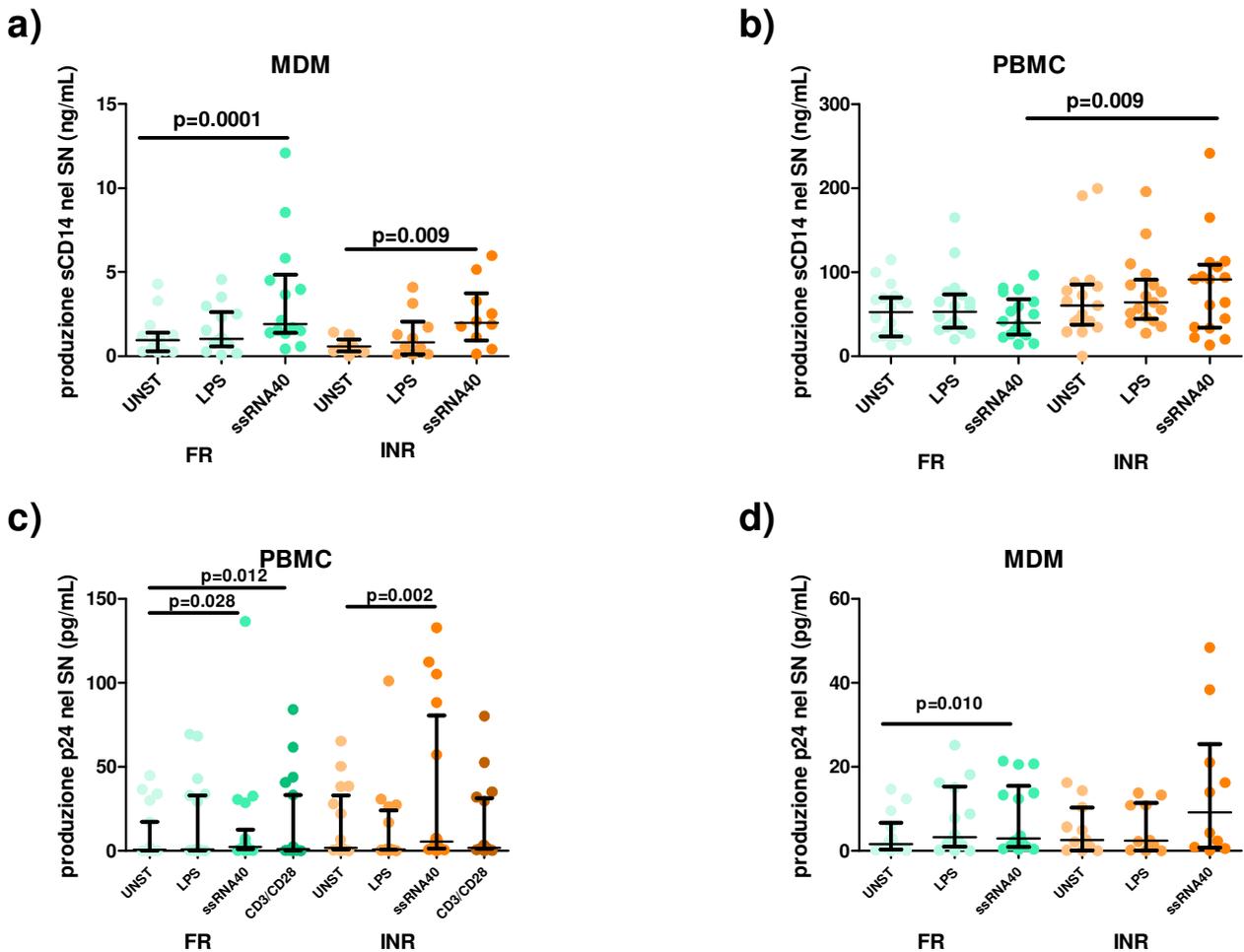


Figura 9. La stimolazione virale induce rilascio di sCD14 e p24 in pazienti in corso di HAART con un diverso recupero immunitario.

a) Differenze interessanti sono emerse stimolando la coltura di MDM. Il solo stimolo virale è stato in grado di aumentare la produzione di sCD14 nei FR ($p=0.0001$) e negli INR ($p=0.009$), senza differenze tra i due gruppi. **b)** Al contrario, la produzione di sCD14 da parte dei PBMC non sembrava risentire della stimolazione dei TLR nè nel gruppo dei FR, nè in quello degli INR. Tuttavia, confrontando i gruppi tra di loro è emerso che dopo stimolazione con ssRNA gli INR avevano livelli significativamente più alti ($p=0.009$).

c) Nonostante i FR mostrassero una produzione spontanea di p24 da parte dei PBMC minore rispetto agli INR ($p=0.084$), non abbiamo riscontrato altre differenze confrontando i due gruppi. In modo interessante, mentre nei FR la produzione di p24 è aumentata dopo stimolazione dei TLR (LPS $p=0.061$; ssRNA $p=0.028$; CD3/CD28 $p=0.012$), negli INR solo l'esposizione a ssRNA si è tradotta in un incremento di p24 ($p=0.0015$). **d)** In accordo con questi dati, la stimolazione degli MDM con LPS e ssRNA ha portato ad un aumento di p24 nei FR ($p=0.068$; $p=0.010$; rispettivamente) ma non negli INR. Tuttavia, confrontando i due gruppi tra di loro, non abbiamo riscontrato alcuna differenza.

Tabella 7. Caratteristiche dei pazienti in studio

	HIV+ Totali n=30	CR n=14	PR n=12	LTNP n=4	p
Sesso (m), % °	21 (72)	11 (78)	7 (58)	4 (100)	.24
Età (anni), IQR*	43.5 (36-51)	43 (36-52)	48 (39-53)	40(34-44)	.33
Fattori di rischio (%) °					.87
<i>Eterosex</i>	12 (41)	5 (36)	5 (42)	2 (50)	
<i>Omo/Bisex</i>	17 (59)	9 (64)	7 (58)	2 (50)	
Nadir CD4 (cell/mmc), (IQR)*	205 (81-319)	285 (129-365)	145 (62-249)	n/a	.16
CD4 correnti (cell/mmc), (IQR)*	650 (394-835)	860 (750-1020)	367(303-406)	689 (589-791)	.013
CD8 correnti (cell/mmc), (IQR)*	937 (628-1228)	973 (667-1224)	913 (351.5-1104)	1365 (612-1601)	.54
Rapporto CD4/CD8 (IQR)*	0.63 (0.41-1.17)	0.86 (0.98-1.24)	0.43 (0.29-0.55)	0.41 (0.41-1.18)	.028
Durata infezione HIV, anni (IQR)*	10.5 (5-14.5)	12 (7-16)	9 (5-17)	8.5 (7-11)	.75
Durata HAAR, anni (IQR)*	5.5 (3-11)	7 (4-12)	4.5 (2-11)	n/a	.18
Tipo di HAART °					1
<i>2NRTI+PI</i>	10 (33)	5 (29)	5 (42)	n/a	
<i>2NRTI+NNRTI</i>	16 (53)	9 (64)	7 (58)	n/a	
Diagnosi di AIDS (no) °	22 (76)	11 (78)	8 (67)	4 (100)	.27
Co-infezione HCV (si) °	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
HIV-RNA (Log cp/mL) corrente*	1.59 (1.59-1.59)	1.59 (1.59-1.59)	1.59 (1.59-1.59)	3.06 (1.95-3.71)	.001

NOTE: * I dati sono presentati come mediane e range interquartili (IQR), analisi statistiche Kruskal-Wallis e Mann-Whitney; ° i dati sono presentati come numeri assoluti e percentuali, analisi statistiche Chi-quadro e test esatto di Fisher. CR, *Complete Responders* (CD4 \geq 500/mmc; HIV-RNA<40cp/mL); PR, *Partial Responders* (CD4<500/mmc; HIV-RNA<40cp/mL); LTNP, *Long Term Non Progressors* (CD4>500/mmc da almeno 7 anni, non in terapia); HAART, terapia antiretrovirale ad alta efficacia; NRTI, inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa; NNRTI, inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa; PI, inibitori della proteasi; LPS, Lipopolisaccaride.

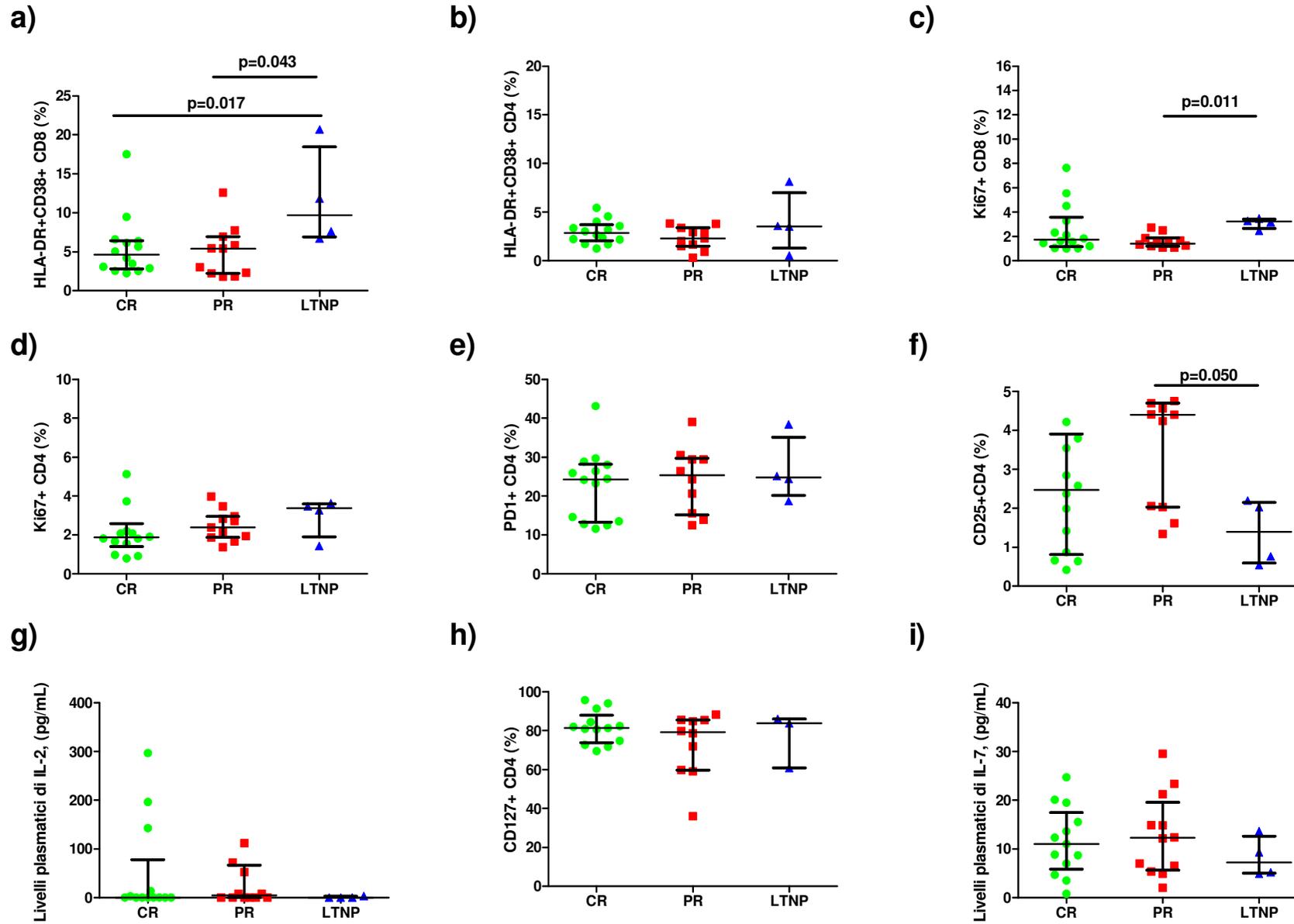
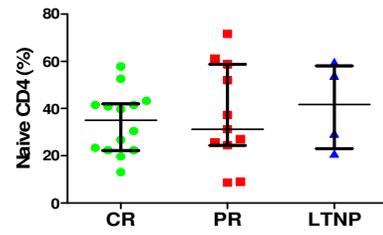


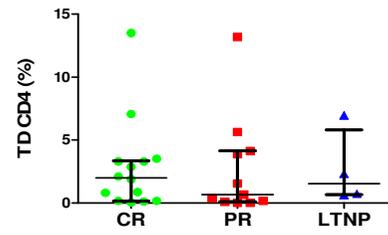
Figura 10. I LTNP mostrano un fenotipo più attivato rispetto ai pazienti in corso di terapia antiretrovirale.

a-b) Un'analisi dell'attivazione T-cellulare, definita come la co-espressione di HLA-DR e CD38, ha rivelato importanti differenze tra LTNP, CR e PR. **a)** In particolare, livelli significativamente diversi di HLA-DR+CD38+ sono stati osservati a carico del comparto CD8 (CR vs PR vs LTNP $p=.044$), con i LNTP che mostravano una maggiore attivazione sia rispetto ai CR ($p=.017$) sia ai PR ($p=.043$), mentre non c'era nessuna differenza tra i due gruppi in terapia. **b)** Un comportamento analogo è stato riscontrato anche nel comparto CD4, senza tuttavia risultare significativo da un punto di vista statistico. **c)** Anche per quanto riguarda i livelli di Ki67+CD8, i LTNP si sono caratterizzati per livelli più alti (CR vs PR vs LTNP $p=.060$), risultando però significativi solo verso i PR ($p=.011$). **d)** Nessuna differenza, invece, è stata osservata nel comparto CD4. **e)** L'espressione di PD-1 sui linfociti CD4 è risultata paragonabile tra i tre gruppi in studio. **f)** Per quanto riguarda il sistema di IL-2, i PR hanno mostrato maggiori livelli di CD25 sui linfociti T CD4, raggiungendo la significatività solo quando confrontati con il gruppo dei LTNP ($p=.050$). **g)** Questo comportamento si è riflesso anche nei livelli plasmatici di IL-2, seppur non raggiungendo la significatività statistica. **h-i)** Nessuna differenza è stata osservata nel sistema IL-7, sia in termini di espressione di CD127 sui CD4, sia in termini di livelli plasmatici di citochina.

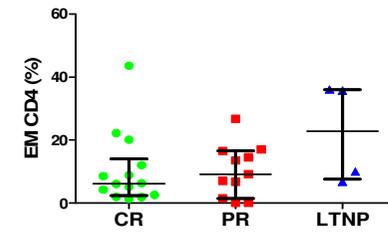
a)



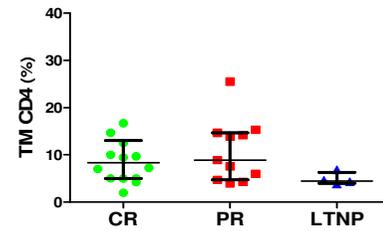
b)



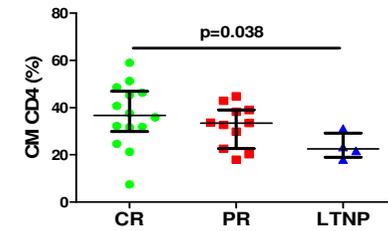
c)



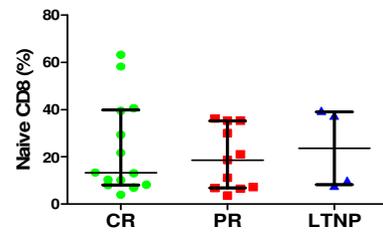
d)



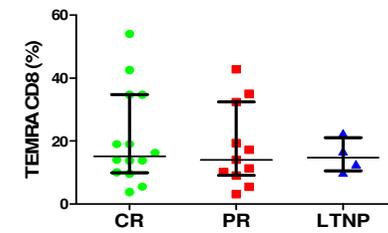
e)



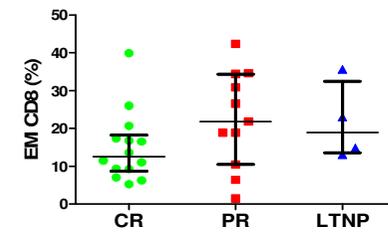
f)



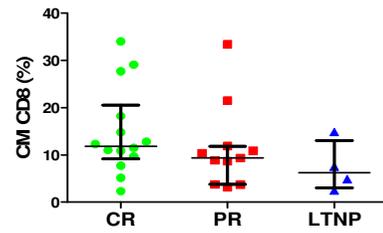
g)



h)



i)



l)

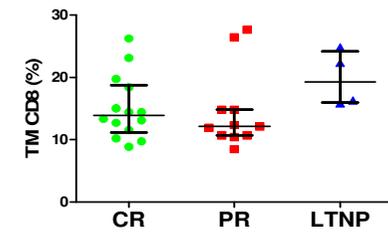


Figura 11. I soggetti in terapia con diversa risposta immunologica e i LTNP mostrano non mostrano differenze significative nella distribuzione dei diversi subset T-linfocitari.

a-d) Per quanto riguarda il subset CD4, non abbiamo osservato alcuna differenza tra i tre gruppi in studio nella proporzione di cellule naive, a differenziazione terminale (TD), di memoria effetttrici (EM) e di memoria di transizione (TM). **e)** L'unica differenza riguardava la proporzione di cellule di memoria centrale -CM- ($p=.082$), con i CR che mostravano una proporzione maggiore rispetto ai LTNP ($p=.038$). **f-I)** Nessuna differenza tra i gruppi è stata invece osservata nel comparto CD8 per quanto concerne la proporzione di cellule naive, TEMRA, EM, CM e TM.

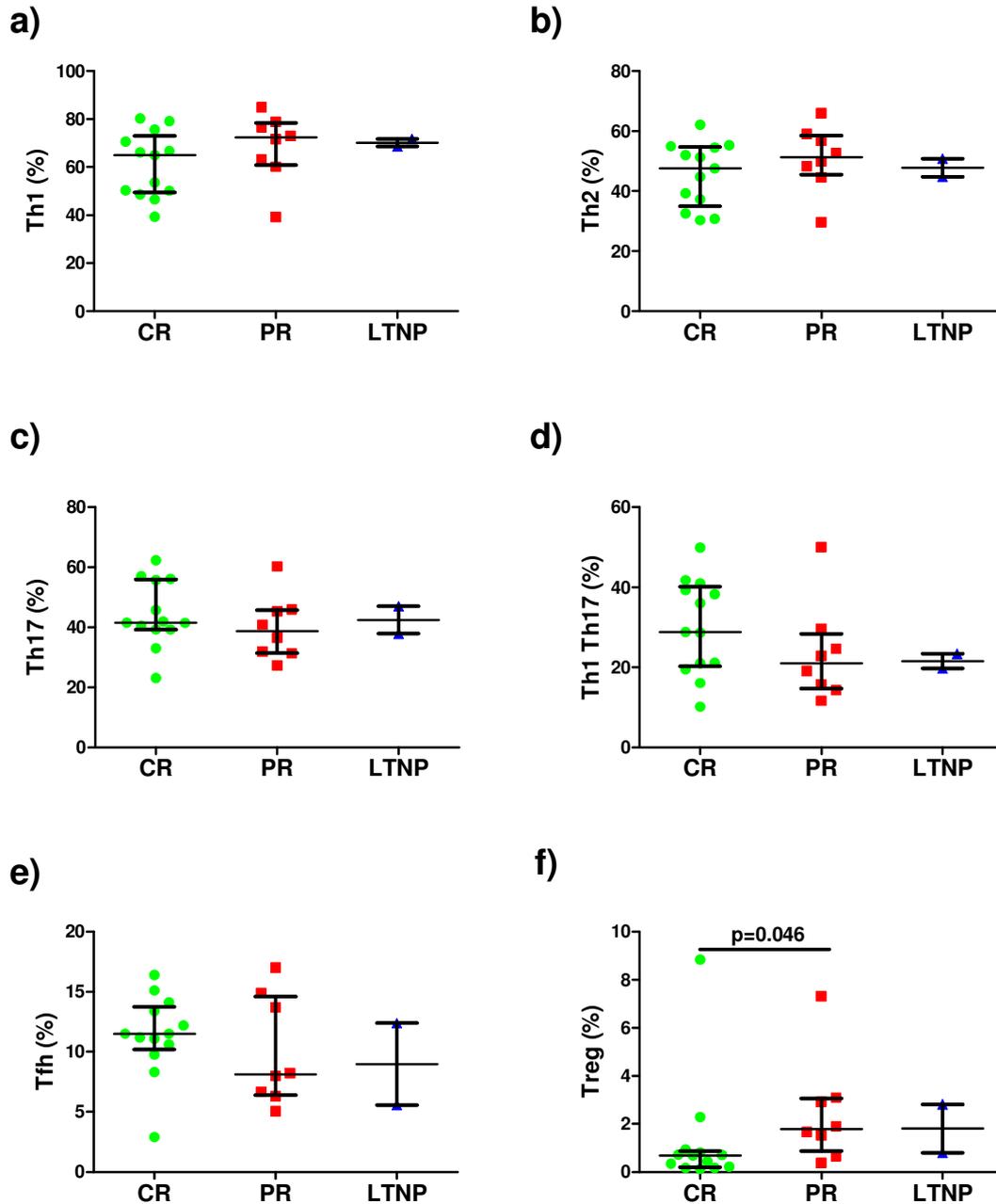


Figura 12. I soggetti in terapia con diversa risposta immunologica e i LTNP non mostrano grandi differenze nella distribuzione dei diversi sottotipi di linfociti T-helper.

a-f) Sebbene CR, PR e LTNP abbiamo mostrato equiparabili livelli di Th1, Th2, Th17, Th1-Th17 e Tfh, una tendenza verso più bassi livelli di Treg è stata riscontrata nel gruppo dei CR ($p=0.083$), raggiungendo la significatività nel confronto con i PR ($p=0.046$).

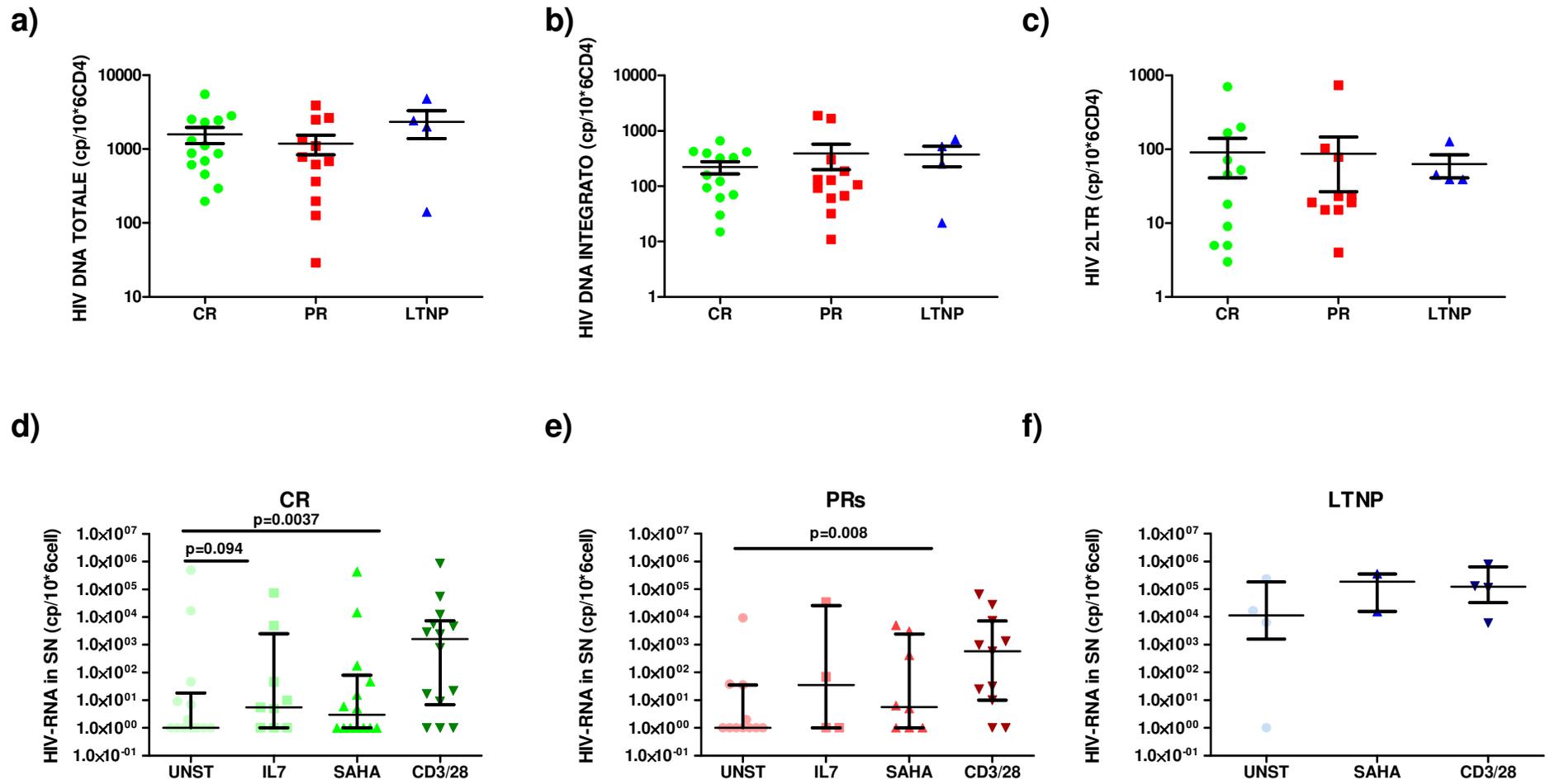


Figura 13. L'entità dei reservoir virali di HIV sembra essere diversa nei pazienti in terapia rispetto ai LTNP.

a-c) Le dimensioni dei reservoir virali sono state valutate misurando le tre diverse forme genomiche di HIV: DNA totale, DNA integrato e circoli 2-LTR. **a)** I soggetti LTNP sembravano caratterizzarsi per un maggior contenuto di DNA totale, seppur non significativo da un punto di vista statistico. **b-c)** Medesimo comportamento è stato riscontrato per il DNA di HIV integrato e per i 2-LTR. **d-f)** Poichè ad oggi, di grande fascino e interesse sono le strategie di eradicazione di HIV [51], abbiamo voluto indagare la capacità dei CD4 di rispondere ad agenti in grado di riattivare il virus nei nostri pazienti. **d)** Il gruppo CR ha mostrato un aumento della produzione virale in seguito a stimolazione con IL-7 ($p=.094$) e CD3/CD28 ($p=.0037$), mentre non ha risposto alla stimolazione con SAHA. **e)** I pazienti PR hanno invece aumentato la produzione di HIV solo dopo stimolazione con CD3/CD28 ($p=.008$). **f)** I LTNP non hanno risposto ad alcuno stimolo.

Tuttavia, confrontando i gruppi tra di loro sono emerse delle differenze interessanti. I LTNP, infatti si caratterizzavano per una più alta produzione spontanea di virus ($p=.168$) che diventava significativa dopo stimolazione con SAHA ($p=.088$) e con CD3/CD28 ($p=.034$). Anche quando abbiamo confrontato i gruppi a due a due, i LTNP hanno mostrato una produzione virale maggiore (UNST: LTNP vs CR $p=.156$, LTNP vs PR $p=.066$; SAHA: LTNP vs CR $p=.056$, LTNP vs PR $p=.047$; CD3/CD28 LTNP vs CR $p=.022$, LTNP vs PR $p=.016$). Nessuna differenza è stata osservata tra CR e PR (UNST $p=.711$; IL-7 $p=.937$; SAHA $p=.641$; CD3/CD28 $p=.934$).

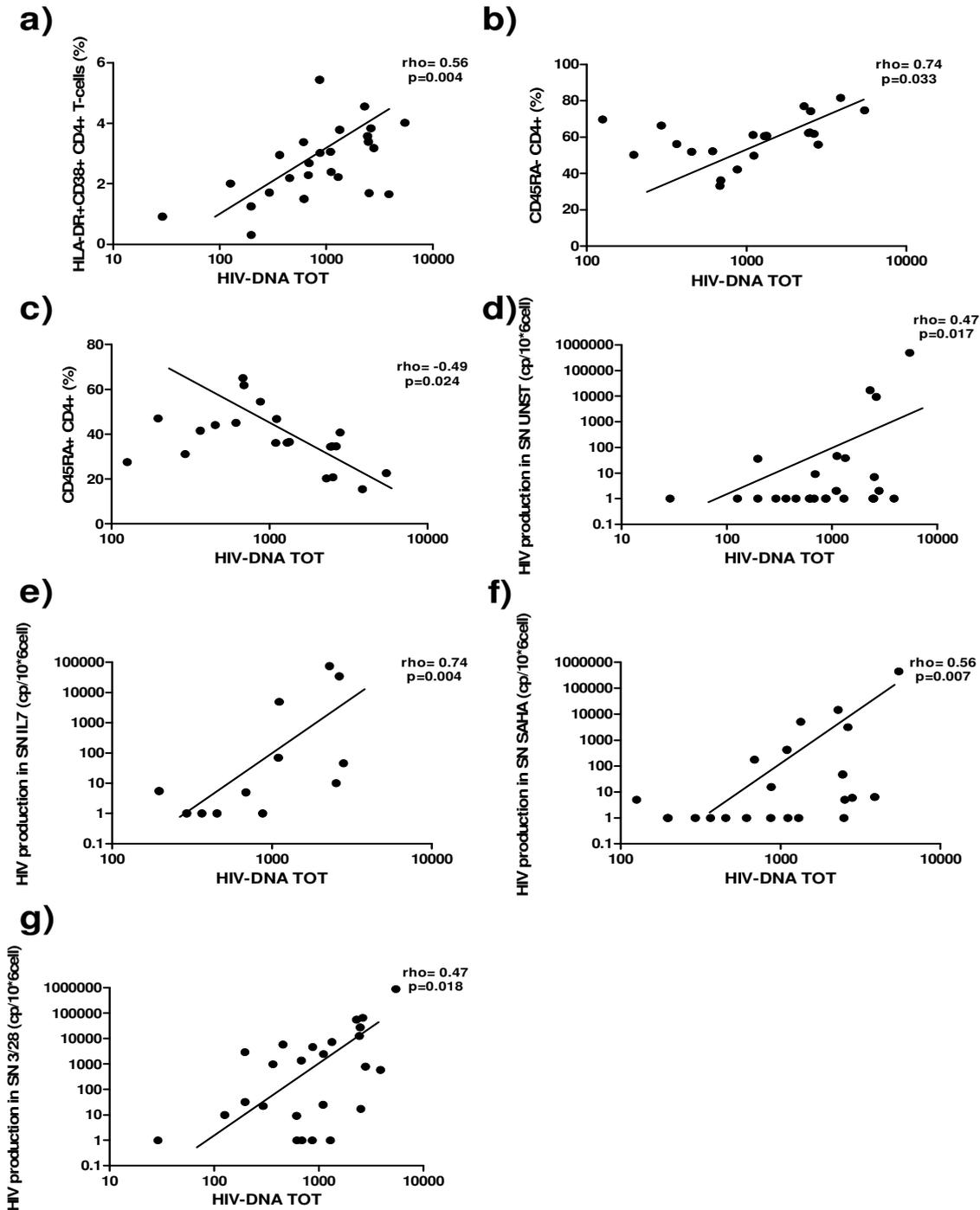


Figura 14. La quantità di DNA totale di HIV correla con l'attivazione delle cellule T CD4 e con la loro capacità di riattivare il virus dopo stimolazione.

Tra le correlazioni significative, alcune sono risultate un pochino deboli (valore assoluto di $\rho < 0.5$).

a-c) In modo interessante, la misura del DNA totale di HIV correla positivamente con l'attivazione (HLA-DR+CD38+ CD4+ T-cells) delle cellule T CD4 ($p=0.004$) e con la proporzione di cellule CD4 memory ($p=0.033$), mentre correla negativamente con la proporzione di cellule CD4 naive ($p=0.024$). **d-g)** Inoltre, abbiamo osservato una correlazione positiva tra HIV-DNA totale e la produzione virale spontanea ($p=0.017$), dopo stimolazione con IL-7 ($p=0.004$), con SAHA ($p=0.007$) e con CD3/CD28 ($p=0.018$).