

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO
“Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali”

DIPARTIMENTO
Scienze Biomediche e Cliniche “Luigi Sacco”

CORSO DI DOTTORATO
Malattie Infettive XXVI CICLO



EVOLUZIONE DEL TROPISMO DI HIV-1 IN RELAZIONE ALLE MODIFICAZIONI DI LINFOCITI CD4 E VIREMIA E AL TRATTAMENTO: STUDIO PROSPETTIVO DI COORTE IN PAZIENTI CON INFEZIONE ACUTA/RECENTE E PAZIENTI AIDS PRESENTERS

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Prof.ssa Antonella D'Arminio Monforte

DOTTORANDA

Pamela Tau
R09278

TUTOR

Dr. Stefano Rusconi

A.A.

(ANNO ACCADEMICO 2012/2013)

Indice

1. INTRODUZIONE	6
1.1 HIV E AIDS	7
1.1.1 Identificazione e isolamento di HIV	7
1.1.2 Classificazione	8
1.2 STRUTTURA, ORGANIZZAZIONE E GENOMA VIRALE	14
1.2.1 Struttura e organizzazione virale	15
1.2.2 Il genoma virale	15
1.3 LE PROTEINE DEL VIRUS HIV	19
1.3.1 Le proteine del capsido	19
1.3.2 Gli enzimi virali	20
1.3.3 Le glicoproteine dell'envelope	22
1.4 IL CICLO REPLICATIVO DI HIV-1	25
1.5 LE CELLULE BERSAGLIO DI HIV	32
1.6 VARIABILITÀ GENETICA DI HIV	34
1.7 CLASSIFICAZIONE DELLE FORME GENETICHE DI HIV.	36
1.8 PATOGENESI DELLA MALATTIA	41
1.8.1 Vie di trasmissione	41
1.8.2 Specificità della risposta anticorpale autologa	43
1.9 TERAPIA ANTIRETROVIRALE	45
1.9.1 Classificazione dei farmaci antiretrovirali	45
1.9.2 Resistenze alla terapia antiretrovirale	49
1.10 TROPISMO DI HIV-1	50

1.10.1 Virus X4 T-cell tropici	52
1.10.2 Virus R5 linfocito-tropici (<i>T cell-tropic</i>)	52
1.10.3 Virus R5 macrofago-tropici (<i>M-tropic</i>)	53
1.10.4 Tropismo e compartimentalizzazione	53
1.10.5 Diffusione e reservoirs virali	54
1.10.6 Tropismo e stadi di infezione	55
1.10.7 Sistemi diagnostici per la determinazione del tropismo virale.	58
1.10.8 Tropismo e carica netta del V3 loop	64
1.11 FATTORI DI PROGRESSIONE DELLA MALATTIA: RUOLO DEL TROPISMO DI HIV-1	65
1.11.1 Fattori implicati nella progressione della malattia	65
1.11.2 Ruolo del tropismo nella progressione	66
2. DISEGNO DELLO STUDIO	68
2.1 CASISTICA	69
2.2 PROTOCOLLO: ANALISI E FOLLOW-UP	72
2.3 TERAPIA	73
2.4 OBIETTIVI DELLO STUDIO	73
2.5 LIMITI DELLO STUDIO	74
3. MATERIALI E METODI	75
3.1 MODALITA' DI RACCOLTA, PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI	76
3.1.1 Raccolta di sangue intero	76
3.1.2 Separazione di plasma da sangue	76
3.1.3 Separazione di cellule mononucleate da sangue periferico	76
3.2. METODICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE	78
3.2.1 Estrazione di RNA virale da plasma	78

3.2.2 Retrotrascrizione a cDNA	79
3.2.3 Estrazione di DNA	80
3.2.4 Amplificazione della regione V3 del gene ENV	82
3.2.5 Rilevamento dei prodotti di PCR	84
3.2.6 Purificazione dei prodotti di PCR	85
3.3. SEQUENZIAMENTO	86
3.3.1 Reazione di sequenza	86
3.3.2 Purificazione dei prodotti di sequenza	87
3.3.3 Caricamento e condizioni di corsa	88
3.3.4 Analisi delle sequenze	88
3.3.5 Ultra deepsequencing	89
3.4. METODI COMPUTAZIONALI	93
3.4.1 Predizione del tropismo virale	93
3.5. ANALISI FILOGENETICA	94
3.5.1 Analisi filogenetica dei sottotipi puri e delle CRFs.	95
3.6 ANALISI BAYESIANA	96
3.7 ANALISI STATISTICA	97
3.7.1. Analisi dei parametri immuno-virologici	98
3.7.2 Valutazione della relazione tra la predizione del tropismo genotipico e i parametri immuno-virologici.	98
4.RISULTATI	99
4.1 ANALISI DI ULTRADEEP SEQUENCING IN RELAZIONE ALL'ANALISI GENOTIPICA DEL TROPISMO VIRALE.	106
4.2 ASSEGNAZIONE DEL SOTTOTIPO HIV-1	111
4.3 ANALISI FILOGENETICA DI ISOLATI DI SOTTOTIPO B	115

4.4 ANALISI DESCRITTIVA	118
4.5 ANALISI DEI PARAMETRI IMMUNO-VIROLOGICI	120
4.6 ANALISI MULTIVARIATA DEL NUMERO DI CELLULE T CD4+ NEI PRIMI SEI MESI NEI PAZIENTI SIA CON INFEZIONE ACUTA/RECENTE SIA AIDS PRESENTERS	128
4.7 ANALISI MULTIVARIATA DEL NUMERO DI CELLULE T CD4+ NEI DODICI MESI NEI PAZIENTI SIA CON INFEZIONE ACUTA/RECENTE SIA AIDS PRESENTERS.	130
4.8 ANALISI MULTIVARIATA DEL RECUPERO DI CELLULE T CD4+ NEI PRIMI SEI MESI NEI PAZIENTI SIA CON INFEZIONE ACUTA/RECENTE SIA AIDS PRESENTERS.	132
4.9 ANALISI MULTIVARIATA DEL RECUPERO DI CELLULE T CD4+ NEI DODICI MESI NEI PAZIENTI SIA CON INFEZIONE ACUTA/RECENTE SIA AIDS PRESENTERS.	133
4.10 VALUTAZIONE DELLA RELAZIONE TRA LA PREDIZIONE DEL TROPISMO GENOTIPICO E I PARAMETRI IMMUNO-VIROLOGICI	134
4.11 RISCHIO ASSOCIATO ALLO STADIO AVANZATO DELLA MALATTIA IN ACCORDO CON IL TROPISMO GENOTIPICO.	137
5. DISCUSSIONE	139
6. BIBLIOGRAFIA	145
7. RINGRAZIAMENTI	166

1. Introduzione

1.1 HIV e AIDS

1.1.1 Identificazione e isolamento di HIV

Nell'estate del 1981 le autorità sanitarie statunitensi rilevarono un numero sorprendentemente elevato di casi di polmonite da *Pneumocystis jiroveci* (PJP), di Sarcoma di Kaposi (KS) [1,2,3] e di altre affezioni opportunistiche in soggetti giovani e precedentemente sani nelle aree di New York, Los Angeles [4] e San Francisco. Nel corso dei mesi tali affezioni cominciarono a svilupparsi anche tra i tossicodipendenti che facevano uso di sostanze stupefacenti per via endovenosa. La PJP è un'affezione causata da un protozoo ubiquitario che in soggetti sani è raramente causa di malattia, ma che può essere patogeno in presenza di varie condizioni di immunosoppressione quali neoplasie del sistema emopoietico, trattamenti chemoterapici o immunosoppressivi. Analogamente, il KS è una rara forma di tumore ad eziologia virale, correlata a *Human Herpes Virus 8*, che si riscontra tendenzialmente in soggetti di età avanzata, mentre nei casi osservati era stato diagnosticato in soggetti giovani e in una forma particolarmente aggressiva (Kaposi mucocutaneo e viscerale). Si svilupparono diverse teorie [5,6] riguardo l'aumento di queste affezioni opportunistiche: dal momento che colpivano specifiche categorie di persone, quali omosessuali e tossicodipendenti, inizialmente si pensò che la causa fosse dovuta a comportamenti e abitudini voluttuarie. Il continuo diffondersi di queste affezioni e l'aumento conseguente di dati epidemiologici permise tuttavia di ipotizzare una causa di tipo infettivo. [7] Alla fine del 1981 si giunse alla precisa definizione dei sintomi clinici della nuova patologia, alla quale dalla metà del 1982 si cominciò a fare riferimento come Sindrome da Immunodeficienza Acquisita, AIDS. [8,9] Nel 1983 Barrè-Sinussi *et al.* [10] dell'Istituto Pasteur isolarono un virus contenente l'enzima trascrittasi inversa dai linfonodi di un paziente con linfadenopatia persistente (*Persistent Lymphadenopathy Syndrome*, LAS). In contemporanea il gruppo di Luc Montagnier isolò un virus con caratteristiche sovrapponibili a quelle di HTLV (*human T-cell leukemia virus*), che chiamò LAV (*lymphadenopathy-associated virus*).

In un primo momento, si ipotizzò che il virus isolato dai linfonodi appartenesse a quel gruppo di retrovirus umani.

A sostegno di tale conclusione fu la contemporanea pubblicazione sullo stesso numero di *Science* di uno studio di Gallo *et al.* sull'isolamento di HTLV-III da individui con AIDS.

Tuttavia, sembrava poco verosimile che HTLV fosse l'agente responsabile dell'AIDS, sia a causa della sua forte associazione con le cellule sia per la sua nota scarsa replicazione in colture cellulari. I numerosi casi di AIDS tra gli emofiliaci, inoltre, non potevano essere correlati alla trasmissione di HTLV mediante prodotti plasmatici privi di elementi cellulari, come il Fattore VIII. In aggiunta, poiché HTLV non uccide i linfociti, ma più frequentemente li immortalizza spingendoli verso una crescita incontrollata, la caratteristica perdita di linfociti CD4⁺ (linfociti T *Helpers*) riscontrata nei pazienti AIDS non poteva essere spiegata. Nel frattempo, Levy *et al.* identificarono un retrovirus che denominarono ARV (*AIDS related virus*) [11] isolandolo oltre che da pazienti con AIDS anche da persone sane o oligosintomatiche. In seguito i tre virus, date le loro caratteristiche, furono riconosciuti come appartenenti allo stesso gruppo di retrovirus (*Lentivirinae*). Poiché tuttavia le proteine di tali virus erano distinte da quelle di HTLV, i loro genomi mostravano solo parziali similitudini rispetto al suo genoma e l'iniziale cross-reattività tra le proteine di HTLV-III e quelle di HTLV si mostrò scorretta, nel 1986 l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* diede al virus responsabile dell'AIDS la denominazione tuttora accettata di HIV [12] (*Human Immunodeficiency Virus*).

1.1.2 Classificazione

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) è un virus il cui genoma è composto da due identiche copie di RNA a singola elica a polarità positiva ed è classificato come appartenente alla famiglia delle *Retroviridae*. I Retrovirus, conosciuti fino agli anni ottanta soprattutto per le patologie a carattere neoplastico che provocano in alcune specie animali, sono suddivisi in tre sotto famiglie: *Oncovirinae*, *Spumavirinae* e *Lentivirinae*. Gli Oncovirus raggruppano i virus isolati originariamente come agenti trasformanti; causano sarcomi, leucemie, tumori mammari e, talvolta, immunosoppressione in diverse specie animali.

Appartengono a questa famiglia anche due virus umani: HTLV-I e HTLV-II (*Human T-cell Leukemia Virus*), associati a linfomi delle cellule T e a disordini neurologici. Gli Spumavirus devono la loro denominazione alla capacità di conferire un aspetto schiumoso alle cellule coltivate *in vitro* e a indurre lesioni vacuolari nelle cellule infettate. I Lentivirus sono associati a malattie a lungo decorso ma senza rapporto diretto con le neoplasie. Prima dell'isolamento e caratterizzazione di HIV erano noti solo per patologie provocate in alcune specie di felini ed ungulati.

HIV condivide molte caratteristiche biologiche e molecolari con HTLV, come le modalità di trasmissione, il tropismo verso le cellule T e la capacità di indurre la formazione di sincizi. Tuttavia, HIV viene classificato in modo più appropriato tra i Lentivirus sulla base dell'organizzazione genica, delle analogie di sequenza e delle caratteristiche morfologiche e patologiche. Inoltre, il *core* di HIV è molto simile a quello dei Lentivirus animali. [13] Omologhe sono anche le sequenze aminoacidiche codificate dai geni *pol*. [14] I Lentivirus animali e HIV condividono la complessità del genoma, una *open reading frame* del gene *env* particolarmente estesa e la sovrapposizione dei geni *gag* e *pol*. Infine, un'altra caratteristica che contraddistingue l'intera sottofamiglia è la tendenza dei virus a indurre nei propri ospiti malattie cronico-degenerative, caratterizzate da un lungo periodo di latenza clinica e da un coinvolgimento sia del sistema immunitario sia di quello nervoso.

Sono noti due sierotipi di HIV [15] (Figura 1), denominati HIV-1 e HIV-2. HIV-2 venne identificato per la prima volta nel 1986 nell'Africa Occidentale. I due sierotipi di HIV si differenziano per organizzazione genomica e per virulenza. I loro genomi condividono i tre geni strutturali *gag*, *pol* ed *env*; presentano tuttavia una differente e complessa combinazione di geni regolatori e accessori. Entrambi possono causare la sindrome da immunodeficienza acquisita ma HIV-2 ha, rispetto ad HIV-1, una più bassa virulenza che gli conferisce un più esteso periodo di latenza clinica e una minore infettività. Probabilmente a causa di queste differenze HIV-1 è diffuso in tutto il mondo [16] ed è considerato la causa primaria della pandemia di AIDS, mentre HIV-2 rimane confinato all'area dell'Africa Occidentale [17] e a paesi con forte immigrazione di soggetti provenienti dalla suddetta zona.

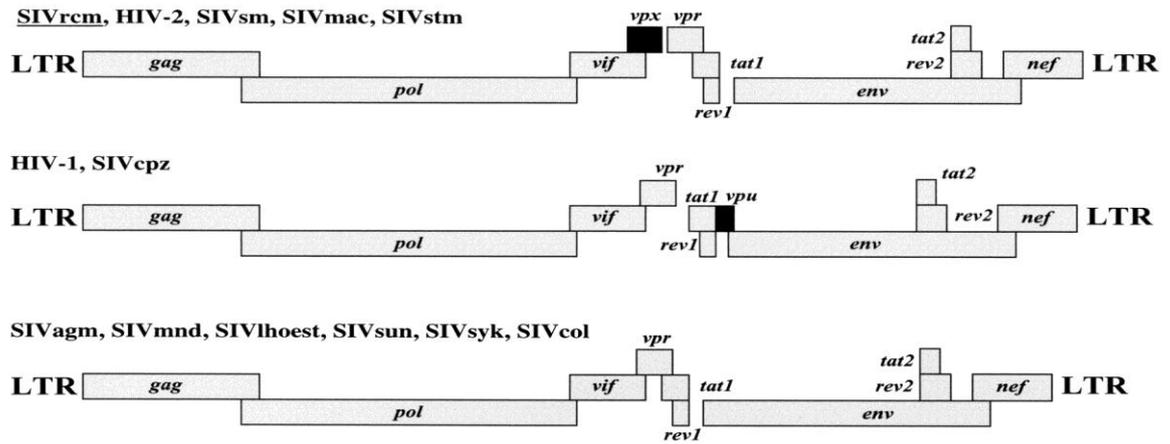


Figura 1. Confronto fra l'organizzazione genomica di HIV-1, HIV-2 e SIV.

La storia evolutiva di HIV-1 e HIV-2 è stata ricostruita a partire dalle informazioni ottenute da alberi filogenetici dei lentivirus dei primati (Figura 2).

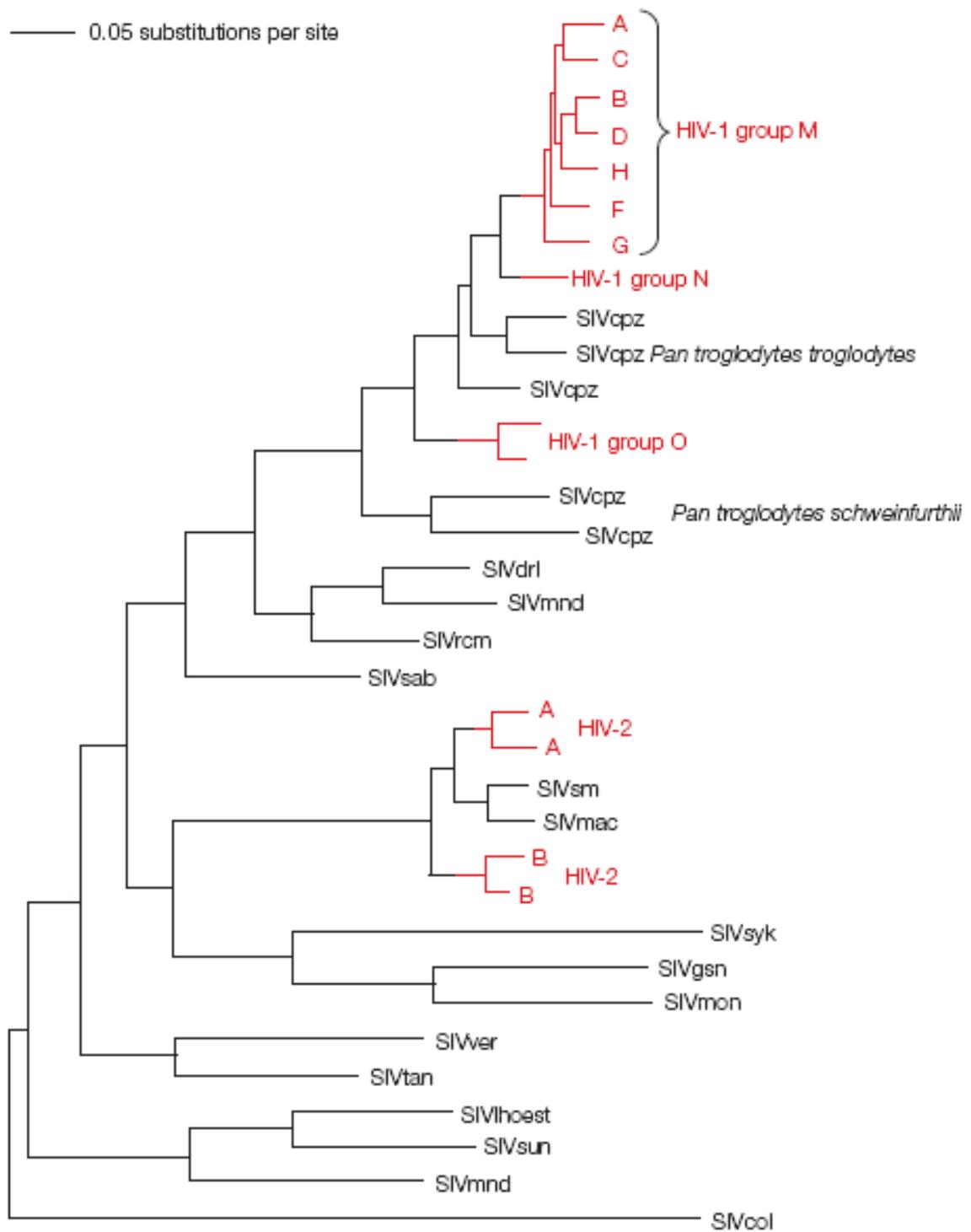


Figura 2. Albero filogenetico dei Lentivirus dei primati che mostra la correlazione tra SIV e HIV.

L'analisi filogenetica ha mostrato come i due sierotipi di HIV siano correlati a differenti forme di SIV [18] (*Simian Immunodeficiency Virus*) e abbiano avuto pertanto origini distinte. HIV-1 è risultato più vicino a SIVcpz, che infetta alcune sottospecie di scimpanzé, quali *Pan troglodytes troglodytes* e *Pan troglodytes schweinfurthii*, che popolano rispettivamente aree equatoriali dell'Africa occidentale e centrale. Al contrario, HIV-2 sembrerebbe maggiormente correlato a SIVsm che infetta le scimmie *sooty mangabey* (*Cercocebus atys*), in particolare nell'Africa occidentale, zona che probabilmente coincide con il luogo di origine di HIV-2. L'analisi filogenetica suggerisce, inoltre, che siano avvenuti molteplici eventi di trasmissione scimmia-uomo, dato il mix di *lineage* HIV-SIV generato. È difficile stabilire con precisione quanti eventi di trasmissione siano intercorsi, probabilmente almeno 4 per HIV-2 e 3 per HIV-1, [19] uno per ciascun gruppo, in accordo con la loro origine indipendente. Tuttavia, gli eventi di ricombinazione inter-specie, comuni tra i lentivirus dei primati, complicano fortemente questo tipo di analisi. Ad esempio il gruppo N sembrerebbe essersi originato dalla ricombinazione tra un ceppo di SIVcpz e un virus strettamente correlato con l'antecessore del gruppo M; tale evento, tuttavia, sarebbe accaduto prima che i gruppi M ed N si diffondessero nell'uomo.

Alcuni dati hanno indicato, inoltre, che lo stesso SIVcpz di *Pan troglodytes troglodytes* sia un virus ricombinante derivato a sua volta da SIVgsn (*SIV Greater Spotted Monkeys*) e SIVrcm [20] (*SIV Red-capped Mangabeys*), due patogeni che colpiscono scimmie predate dagli scimpanzé.

Il gruppo O non è invece originato da un ceppo di SIV presente negli scimpanzé, ma da un ceppo presente nei gorilla dell'Africa occidentale (SIVgor). [21]

Questi risultati sono di estremo interesse poiché indicano che SIVcpz, come HIV, è derivato da un evento di infezione interspecie, fornendo così una conferma indiretta all'ipotesi sull'origine dei Lentivirus umani. Secondo l'ipotesi più accreditata, il virus è stato trasmesso all'uomo attraverso l'esposizione cutanea o mucosale a sangue infetto, causata dalle attività venatorie o di macellazione di animali infetti.

Un'ulteriore ipotesi sull'origine di HIV-1 è rappresentata dalla teoria "OPV/AIDS". Secondo questa teoria, la zoonosi di HIV è stata causata dalla contaminazione del vaccino orale contro la polio preparato utilizzando cellule di scimpanzé infette da SIVcpz.

Recenti studi hanno tuttavia dimostrato che il virus SIVcpz è endemico nella popolazione di scimpanzé ma è filogeneticamente molto differente da tutti i ceppi di HIV-1. [22]

Ulteriori studi hanno dimostrato che il gruppo M di HIV-1 ha avuto origine cinquanta anni prima dello sviluppo del vaccino contro la polio e che all'interno di campioni archiviati di OPV non era presente il virus SIVcpz o DNA di scimpanzé permettendo quindi di smentire tale ipotesi. [23] L'analisi filogenetica basata sulle sequenze del gene *env* [24] ha permesso di suddividere HIV-1 in tre distinti gruppi: M (*Major*), O (*Outlier*) e N (Non-M, Non-O o *New*).

Il gruppo M, che da solo sostiene la maggioranza delle infezioni, può essere a sua volta suddiviso in nove sottotipi o *clades* (A-D, F-H, J e K) e quattro sotto-sottotipi per il ceppo A e due per il ceppo F (A₁, A₂, A₃, A₄ e F₁, F₂). [25]

I gruppi O e N sono ancora poco conosciuti e non sono suddivisi in sottotipi. Allo stesso modo HIV-2 comprende sette sottotipi (A-G). Recentemente è stato identificato un nuovo gruppo di HIV-1, denominato P, isolato da una donna camerunense in Francia, [26] il cui ceppo è risultato strettamente correlato al virus dei gorilla (SIVgor) e non ha mostrato alcuna evidenza di ricombinazione con altri *lineage* di HIV-1 (Figura3).

1.2.1 Struttura e organizzazione virale

HIV, in quanto Retrovirus, è un virus di piccole dimensioni caratterizzato dalla presenza di un involucro virale esterno detto “envelope” costituito da una membrana lipidica, nella quale sono inserite proteine della matrice a livello della sua superficie interna, e glicoproteine integrali di membrana che, protrudendo attraverso la membrana stessa, formano la superficie esterna della particella virale. All’interno di questa struttura di rivestimento si trova il capsido virale, una struttura proteica che ha la funzione di contenere il core virale, costituito dal genoma virale e dagli enzimi necessari ai processi replicativi. [28]

1.2.2 Il genoma virale

Il genoma di HIV-1 è lungo 9,7 kb, ed è costituito da tre geni strutturali e da almeno sei geni regolatori, nonché da quelle regioni del genoma con ruolo di sequenze regolatrici situate alle due estremità del genoma e denominate *Long Terminal Repeat* (LTR) (Figura 4).

I geni strutturali comprendono:

- ***gag-pol***: sono due geni distinti, ma parzialmente sovrapposti nel genoma virale. L’RNA- messaggero *gag-pol* codifica per un precursore proteico da cui derivano le componenti strutturali proteiche del capsido virale (p24), del nucleocapsido (p9 e p7) e della matrice (p17), nonché gli enzimi virali trascrittasi inversa RNasi-H, proteasi e integrasi.
- ***env***: collocato in posizione terminale 3’ del genoma virale, questo gene codifica per un precursore proteico da cui si formano successivamente le glicoproteine di superficie e integrali di membrana, rispettivamente chiamate gp 120 e gp 41, direttamente coinvolte nei meccanismi di infezione.

Grazie a studi di comparazione tra genomi di isolati virali diversi, si è giunti all'osservazione che il gene *env* è soggetto a un elevato grado di variabilità, specialmente a livello delle regioni variabili V1, V2, V3, V4 e V5.

Tra i geni regolatori si riconoscono invece:

- ***tat***: codifica per una proteina indirizzata nel nucleo che ha effetto di aumento della produzione di proteine regolatrici, incrementando il livello di RNA-messaggeri.
- ***rev***: codifica per una proteina nucleare con funzionalità di modulazione sulle proteine virali *gag-pol* o *env* prodotte.

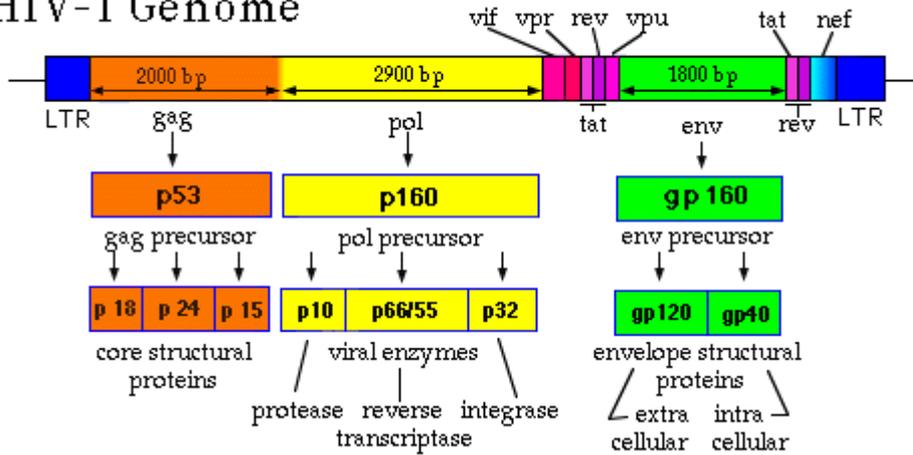
I geni accessori comprendono:

- ***nef***: codifica per una proteina che sembrerebbe avere un controllo negativo sulla replicazione virale diminuendo l'espressione di geni associati all'LTR
- ***vif***: codifica per il Fattore di Infettività Virale, necessario per l'infezione di alcune linee cellulari.
- ***vpr***: codifica per una proteina che ha la funzione di aumentare la velocità di replicazione di HIV.
- ***vpu***: codifica per una proteina che aumenta la velocità di esportazione del virus, diminuendo parallelamente la velocità di accumulo di tutte le proteine virali all'interno delle cellule infettate.

Gli RNA-messaggeri dei geni regolatori, in particolare di *tat*, *rev* e *nef*, sono rintracciabili precocemente durante l'infezione, sia nei linfociti che nei monociti, e sono espressi simultaneamente, sebbene in quantità proporzionalmente differenti.

Infine, collocate alle estremità del genoma virale, le regioni regolatrici LTR hanno la funzione di legarsi con fattori cellulari sia costitutivi che inducibili e con fattori virali, modulando in tal modo la trascrizione basale dell'RNA virale, la trascrizione dipendente dagli stimoli mitogenici, e l'espressione dei prodotti genici virali. (Figura 4)

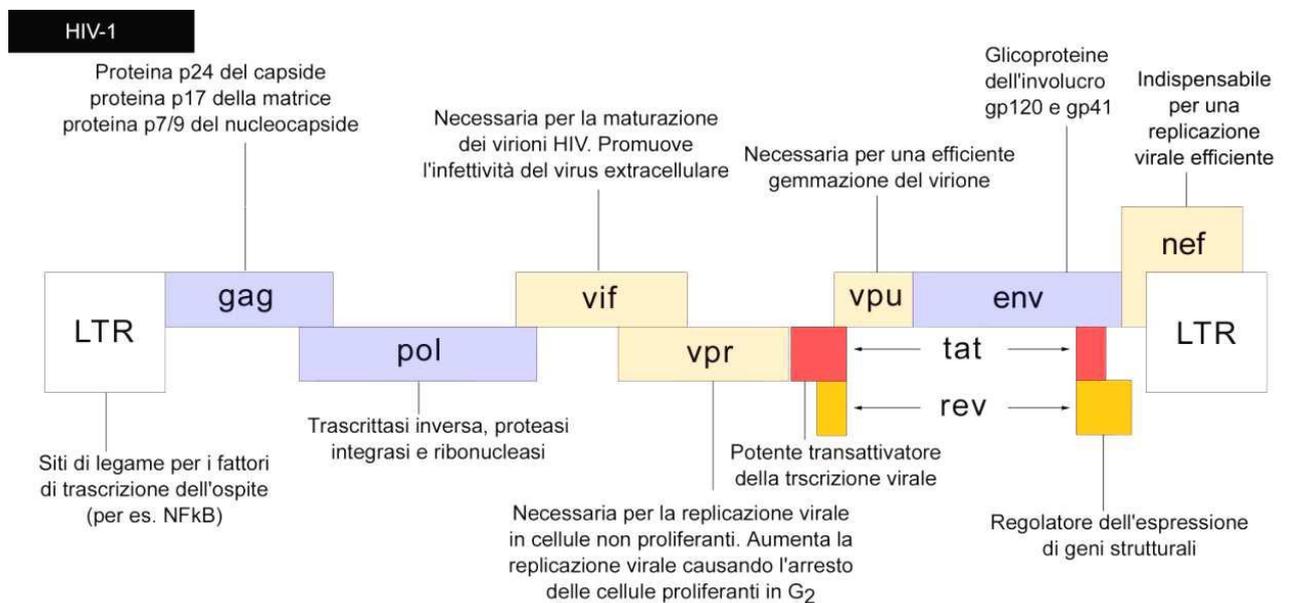
HIV-1 Genome



ccz/95

Figura 4. Genoma di HIV-1

Il genoma di HIV-2 si distingue da quello di HIV-1 per alcune differenze nei geni regolatori (Figura 5). [27]



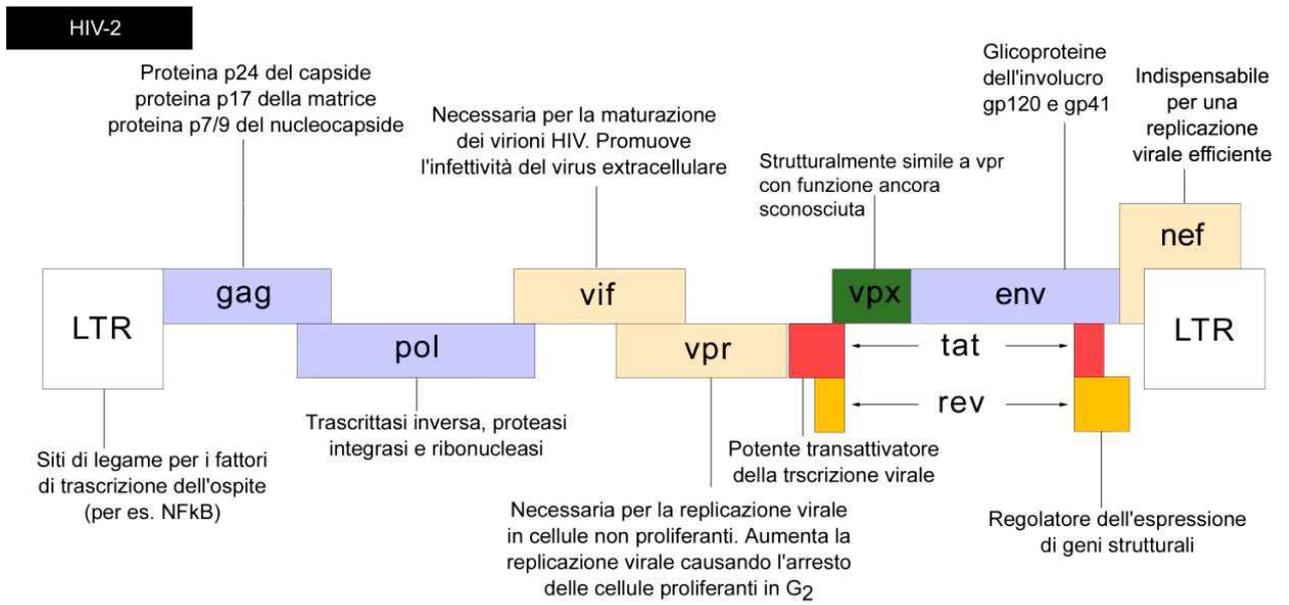


Figura 5. Mappa del genoma di HIV-1 e HIV-2.

1.3 LE PROTEINE DEL VIRUS HIV

1.3.1 Le proteine del capsid

Il capsid racchiude l'RNA genomico virale e presumibilmente svolge una funzione regolatrice nelle fasi iniziali del processo di replicazione.

La formazione del core maturo prevede la scissione proteolitica del prodotto iniziale del gene *gag* (ovvero la poliproteina p55) nelle proteine strutturali interne p17, p24, p7, p9, p6 e p2 [29]. Essa è mediata dalla Proteasi virus-specifica.

_ **p17**: Proteina codificata da sequenze situate a livello della terminazione 5' del gene *gag*; la proteina p17, in forma matura, si dispone tra il capsid e l'envelope del virione, dando origine alla matrice virale [30]. Durante l'assemblaggio delle particelle virali la proteina della matrice subisce una fosforilazione post-traduzionale del residuo di tirosina C-terminale, ad opera di una protein kinasi cellulare: questa modificazione sembra facilitare il trasporto del DNA provirale nel nucleo delle cellule derivate dallo stipe monocitico-macrofagico, che esprimono l'antigene CD4 [31, 32]. La proteina p17 si configura, quindi, come parte del complesso nucleoproteico che media l'importazione nucleare del genoma virale, in associazione con le proteine accessorie prodotte dal gene *vpr* [33, 34, 35].

_ **p24**: Rilasciata dalla porzione centrale della poliproteina p55 in seguito a taglio enzimatico mediato dalla Proteasi virale, la proteina p24 rappresenta la subunità maggiore del guscio capsidico. In forma matura essa contiene circa 240 aminoacidi, ha un peso molecolare compreso tra 24 e 27 kd ed è caratterizzata da un alto grado di idrofobicità. La poliproteina p55 media il corretto assemblaggio delle particelle virali: interazioni specifiche della p24 con le proteine dell'ospite, così come modificazioni post-traduzionali, sembrano assumere un ruolo importante nelle fasi precoci dell'infezione da virus HIV [36]. Studi genetici condotti su ceppi virali mutati a livello del precursore proteico p55, hanno identificato numerosi domini funzionali nella proteina p24.

Delezioni a livello del terminale carbossilico bloccano la replicazione virale, influenzando maggiormente l'assemblaggio del nucleocapside piuttosto che il rilascio del virione.

Delezioni a livello del dominio N-terminale, sebbene inibiscano la proliferazione del virus, mantengono nei mutanti la capacità di assemblare e rilasciare particelle virali con la stessa efficienza del ceppo *wild-type* [37, 38]. Queste scoperte identificano nella porzione C-terminale della proteina p24 il dominio regolante l'assemblaggio del nucleocapside. La sua perdita si associa all'incapacità da parte della poliproteina p55 di dirigere il processo di formazione dei virioni.

_ **p7/p9**: Il taglio mediato dalla Proteasi virale a livello della porzione C-terminale della poliproteina Gag produce la proteina p15. All'interno del virione in formazione si originano due proteine basiche e idrofiliche dalla scissione proteolitica di p15: p7 e p9, con un peso molecolare di 7 e 9 kd rispettivamente. In forma matura esse legano l'RNA genomico virale nel core proteico: ogni molecola di p7 e p9 sembra coprire da 4 a 6 nucleotidi [39]. Le proteine del nucleocapside interagendo con l'RNA genomico virale ne stimolano la dimerizzazione e sono necessarie per il suo corretto incapsidamento durante la morfogenesi del virione.

1.3.2 Gli enzimi virali

I geni *gag* e *pol* vengono tradotti in una poliproteina di circa 160 kd, che rappresenta il precursore comune delle proteine strutturali del core e degli enzimi associati al virione. Dalla scissione proteolitica di tale poliproteina originano gli enzimi virali Proteasi (PR), Trascrittasi Inversa (RT e RNasi H) e Integrasi (IN).

_ **Proteasi**: in forma matura ha un peso molecolare di 10 kd (p10) e si trova sottoforma di omodimero, costituito da due subunità di 99 aminoacidi ognuna [40]. Dopo il rilascio dal precursore proteico p160, indipendentemente dall'intervento di enzimi virali, l'omodimero completamente attivo della Proteasi virus-specifica inizia il clivaggio dei prodotti dei geni *gag* (p55) e *gag-pol* (p160), dando origine alle proteine finali del core e agli enzimi Retrotrascrittasi e Integrasi [40].

Mutagenesi sito-specifiche, volte a evidenziare il ruolo della Proteasi nella replicazione virale, indicano che mutazioni a livello del gene PR non influenzano l'espressione dell'enzima ma ne bloccano l'attività, dando luogo a virioni non infettanti, contenenti precursori Gag e Gag-Pol non tagliati [41, 42, 43]. Il sito catalitico della Proteasi virus-specifica è formato da entrambe le subunità ed è in grado di accogliere un substrato di 7 aminoacidi. L'entrata al sito di legame, posto al di sopra del sito attivo, è coperta da due strutture dell'omodimero (*hairpin*), che si muovono per annettere il substrato.

L'analisi della sequenza terziaria della PR e dei suoi substrati oligopeptidici, ha fornito informazioni rispettivamente per identificare composti che ne inibiscono l'attività enzimatica e per disegnare inibitori di questo enzima virale critico [44, 45].

_ **Retrotrascrittasi (RT) e Ribonucleasi H (RNasi H):** la Retrotrascrittasi è una polimerasi RNA-dipendente, che sintetizza DNA a partire da RNA.

L'attività enzimatica richiede la presenza di un *primer* oligonucleotidico legato al filamento stampo, rappresentato da una molecola di tRNA_{lys} [46, 47, 48, 49]. La RNasi H agisce durante la retrotrascrizione e, degradando la parte a RNA degli ibridi DNA/RNA, scopre il filamento stampo per la sintesi di DNA. Inoltre, sembra che la RNasi H generi primers oligonucleotidici per il processo di retrotrascrizione.

In forma matura questi due enzimi, si presentano come un etero dimero costituito dalle subunità p66 e p51: l'attività enzimatica risiede nella sub unità p66 che mostra entrambe le sequenze RT/RNasi H, mentre p51, sottoforma di omodimero, è inattiva sebbene contenga la sequenza RT [50, 51, 52]. La struttura del dominio RT in p66 assomiglia a una mano destra dove i subdomini si identificano con le dita, pollice e palmo; il sito catalitico dell'enzima si trova nel palmo e contiene sequenze altamente conservate di altre retrotrascrittasi virali. Diversamente, la conformazione del dominio RT in p51 non mostra alcuna fenditura e gli aminoacidi corrispondenti al sito attivo non sono accessibili per la catalisi [53]. Priva di attività enzimatica, la subunità p51 promuove il contatto del *primer* oligonucleotidico tRNA_{lys}, legato al filamento stampo, che avvia la retrotrascrizione [54, 55]. La Retrotrascrittasi e la Ribonucleasi H sono enzimi indispensabili per la replicazione virale, permettendo ad HIV di passare dalla forma libera circolante (virione) a provirus integrato nella cellula ospite.

_ **Integrasi:** enzima virale che possiede attività sia proteolitica che ligasica [56].

Durante la morfogenesi del virione essa media l'incorporazione covalente del DNA virale a doppio filamento (che rappresenta il substrato) nel genoma della cellula ospite bersaglio. E' richiesto per la replicazione del virus nelle linee cellulari T e nelle cellule derivate dallo stipite monocitico-macrofagico, esprimenti l'antigene CD4 [57, 58, 59]. Nella forma attiva due monomeri di Integrasi interagiscono per formare un dimero: la dimerizzazione è essenziale non solo per l'integrazione, ma anche per l'assemblaggio di questo enzima nei virioni. Ogni molecola di IN mostra un singolo sito catalitico, tuttavia studi sperimentali, condotti su ceppi virali mutati a livello della sequenza IN, suggeriscono l'esistenza di siti di legame distinti per il DNA virale lineare e per il DNA della cellula ospite [60].

1.3.3 Le glicoproteine dell'envelope

Alla superficie esterna dell'involucro lipoproteico sono visibili (soprattutto durante il processo di gemmazione o nei virioni da poco liberati) una serie di proiezioni di 9-10 nm ordinate secondo una simmetria icosaedrica. Ogni proiezione è formata da un trimero di identiche glicoproteine, gp120 e gp41, responsabili dell'attacco al recettore cellulare CD4, tale da permettere la penetrazione del virus nella cellula ospite. In forma matura esse rappresentano il prodotto del gene *env*, da cui derivano per scissione proteolitica del precursore peptidico gp160 (scissione Proteasi mediata).

La glicoproteina di superficie gp120, derivante dalla porzione N-terminale del precursore, contiene i siti di legame per il CD4 e per il corecettore (appartenente alla superfamiglia dei recettori accoppiati alle proteine G), mentre gp41, la glicoproteina transmembranaria derivante dalla regione C-terminale di gp160, presenta un peptide fusogeno responsabile della penetrazione del virione nella cellula bersaglio (Figura 6). [61, 62]

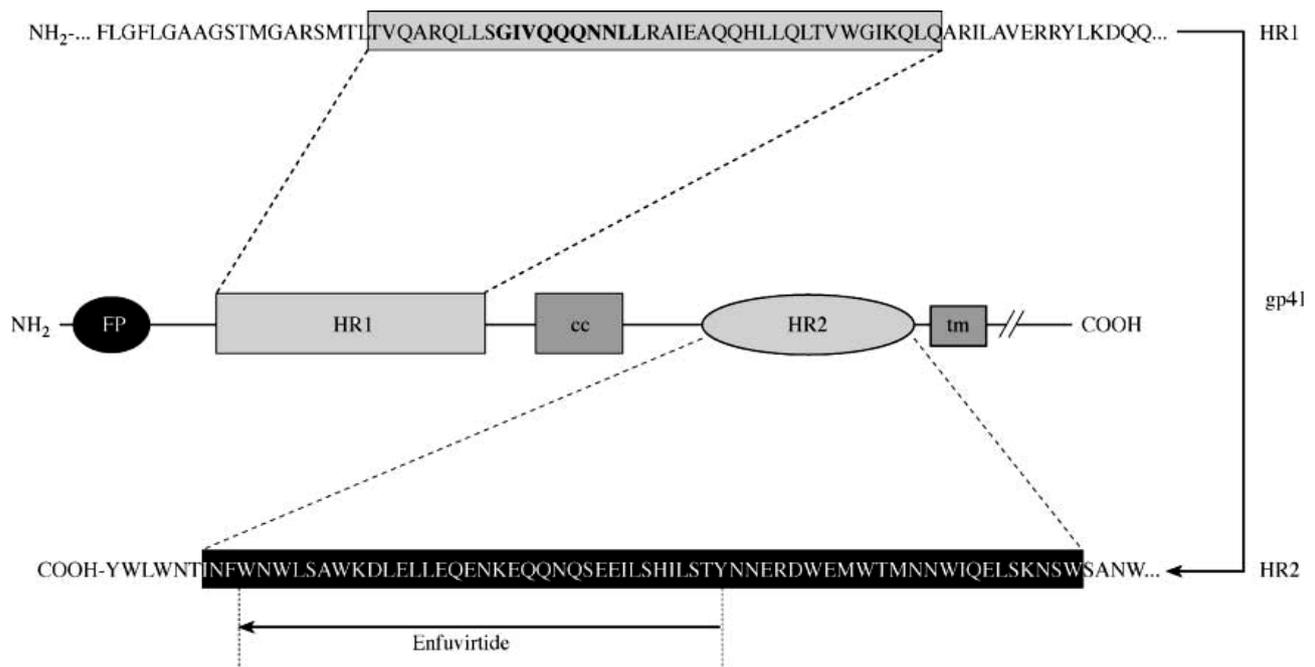


Figura 6. Schema lineare della gp41. Sono rappresentate quattro regioni di notevole importanza funzionale: il peptide di fusione (FP), l'*heptad repeat 1* (HR1), i residui cisteinici (cc) che formano ponti disolfidici, l'*heptad repeat 2* (HR2) e la regione transmembrana (tm). Le sequenze aminoacidiche delle regioni HR1 e HR2 sono descritte in dettaglio.

La gp120 è caratterizzata da 5 regioni variabili denominate V1, V2, V3, V4 e V5, intervallate da 5 regioni conservate denominate C1, C2, C3, C4 e C5; quella maggiormente coinvolta, risulta essere la regione V3. Tale regione può determinare, direttamente o indirettamente, quale corecettore (CCR5 o CXCR4) il virus legherà per entrare nella cellula bersaglio [63].

La fusione fra envelope virale e membrana cellulare è conseguenza di una serie di eventi che iniziano nel momento in cui avviene il legame fra la gp120 e il recettore CD4. Tale interazione induce un cambio conformazionale nella glicoproteina, che smaschera il suo sito criptico specifico per il legame con il corecettore.

A seguito di tale legame, si verifica una seconda modificazione conformazionale necessaria perché la gp41 esponga verso la superficie della membrana cellulare il dominio fusogeno, che va ad inserirsi nel doppio strato fosfolipidico permettendo successivamente la fusione fra le due membrane [61].

1.4 IL CICLO REPLICATIVO DI HIV-1

Il ciclo replicativo di HIV-1, essendo quest'ultimo un virus, ha inizio solo in seguito all'infezione di un organismo cellulare di cui poter sfruttare i cicli bioenergetici e biologici (Figura 7).

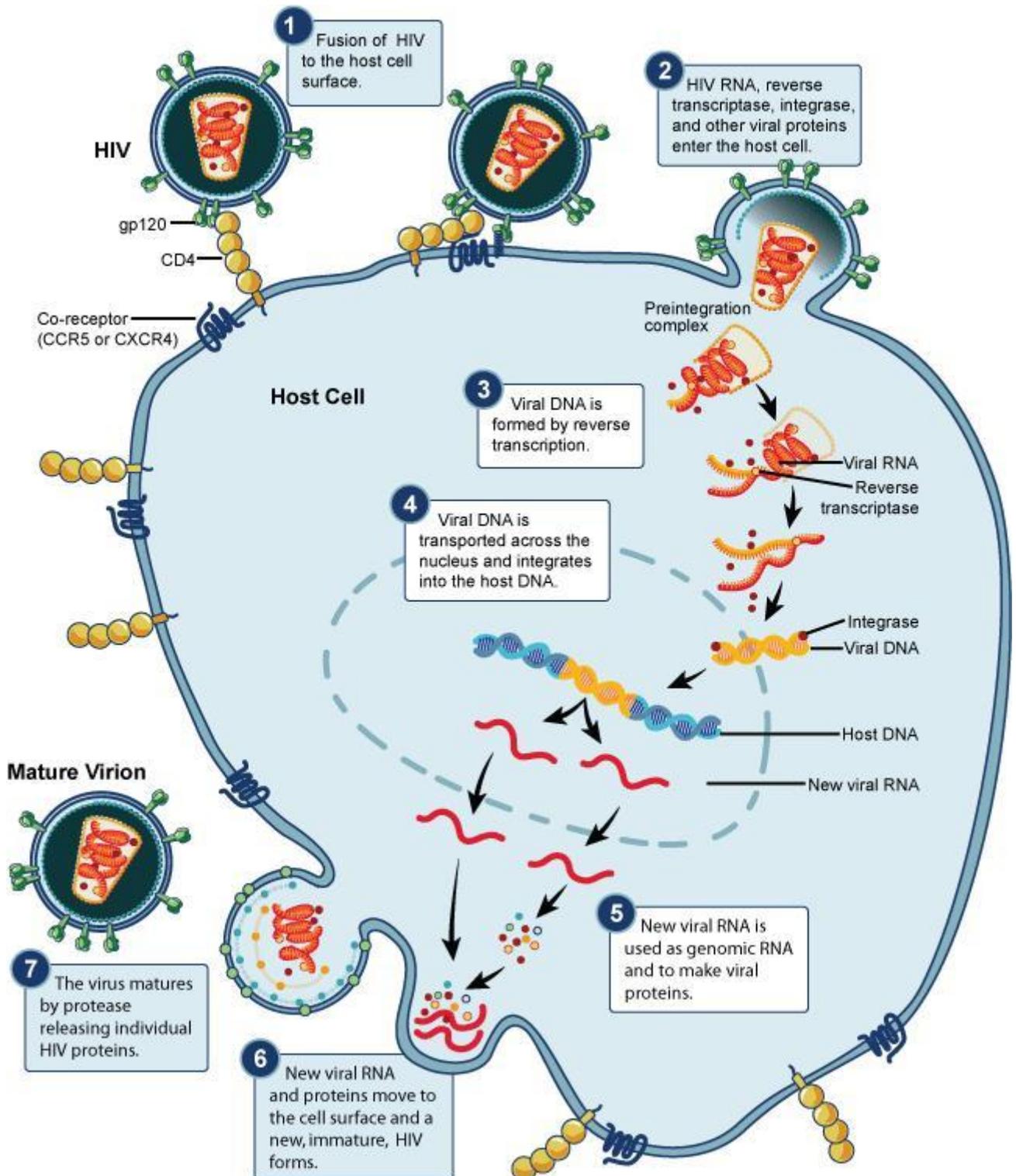


Figura 7. Ciclo replicativo di HIV-1.

Viene solitamente suddiviso in diverse fasi:

• Ingresso nella cellula

Il contatto tra il virione e la cellula bersaglio rappresenta il primo passo necessario all'infezione della cellula. Il virus prende contatto con la cellula mediante il legame tra la glicoproteina gp120 e la molecola CD4, una proteina di 55kDa che rappresenta il recettore principale per il virus. Il CD4 si trova espresso principalmente sui linfociti T helper, considerati il bersaglio d'elezione per HIV, e sui monociti/macrofagi; La glicoproteina CD4 è presente in notevole concentrazione sulla superficie dei linfociti T immaturi e dei linfociti T helper maturi, nonché, in concentrazioni inferiori, sulla superficie di membrana di monociti, macrofagi e cellule dendritiche.

Il legame della gp120 con il suo recettore comporta una modificazione conformazionale della glicoproteina virale che causa l'esposizione e l'attivazione della proteina transmembrana gp41 [64]: una volta esposta gp41 interagisce con la membrana cellulare inducendo la fusione dell'envelope virale con il doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare.

Il legame dell'HIV con il CD4 non è tuttavia sufficiente per l'ingresso del virus nella cellula ospite: al fenomeno partecipano anche altri fattori cellulari che fungono da corecettori.

L'importanza dell'antigene CD4 nell'interazione virus-cellula ospite è nota fino dal 1984, quando fu dimostrato che esso rappresentava il recettore della superficie cellulare usato dalla glicoproteina gp120 dell'envelope virale per l'adesione alla membrana. Peraltro, utilizzando linee cellulari murine transfettate con il gene codificante il CD4 umano, la presenza di questo unico recettore non era sufficiente alla penetrazione del virus: l'esistenza di corecettori necessari per l'entrata di HIV nelle cellule bersaglio parve un'ipotesi plausibile [65].

In seguito all'evidenza del potente effetto inibitorio sulla replicazione virale *in vitro* manifestato da tre chemochine secrete da linfociti T CD8 positivi prelevati da pazienti infetti [66], le ricerche di ipotetici secondi recettori cellulari coinvolti nei meccanismi di adesione virus-bersaglio sono state indirizzate verso questa famiglia di citochine a basso peso molecolare (8-12 kd), strutturalmente e funzionalmente correlate tra loro. Questi mediatori stimolano la motilità dei leucociti (chemocinesi) e la loro migrazione (chemotassi) nelle aree infiammatorie [67], promuovono l'immunità umorale e cellulo-mediata, regolano l'adesione cellulare e il processo angiogenetico, partecipano all'ematopoiesi e, se presenti in elevate concentrazioni, possono comportare la soppressione della risposta infiammatoria [68, 69, 70, 71, 72].

Le α -chemochine sono un gruppo di citochine a basso peso molecolare, caratterizzate dalla presenza di due residui cisteinici amino-terminali separati da un aminoacido (C-X-C). Esse attivano i neutrofili promuovendone l'adesione alle cellule endoteliali, l'attraversamento della parete vasale e l'invasione dei siti infiammatori. Le α -chemochine, presentanti due cisteine adiacenti (C-C), stimolano i monociti, i linfociti, i granulociti basofili e gli eosinofili, svolgendo un ruolo fondamentale nella proliferazione dei linfociti T attivati e nelle patologie allergiche. I fattori solubili antivirali, RANTES (Regulated on activation normal T cell expressed and secreted), MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein) e MIP-1 α , secreti dai linfociti T CD8 positivi, appartengono a questo gruppo.

In seguito all'interazione fra gp120 e corecettore si verificano cambiamenti conformazionali nella gp41: ogni gp41 contiene 2 domini α -elica che modificandosi permettono l'inserimento della porzione ammino-terminale della proteina (peptide fusogeno) all'interno del doppio strato fosfolipidico della membrana citoplasmatica, consentendo così la fusione del pericapside virale con la cellula e il successivo accesso del core virale nel citoplasma [73]

In presenza di una cellula che produce virioni infettanti, può avvenire il contatto della cellula stessa con un'altra cellula CD4+ sana; in tal modo si può avere, tra le due cellule, un evento del tutto analogo a quello degli eventi precoci di fusione tra virus e cellula.

Una singola cellula infettata può fondersi con altre 500 cellule sane, dando luogo a sincizi e a cellule giganti multinucleate, caratterizzate da breve vita [28, 74, 75] (Figura 8)

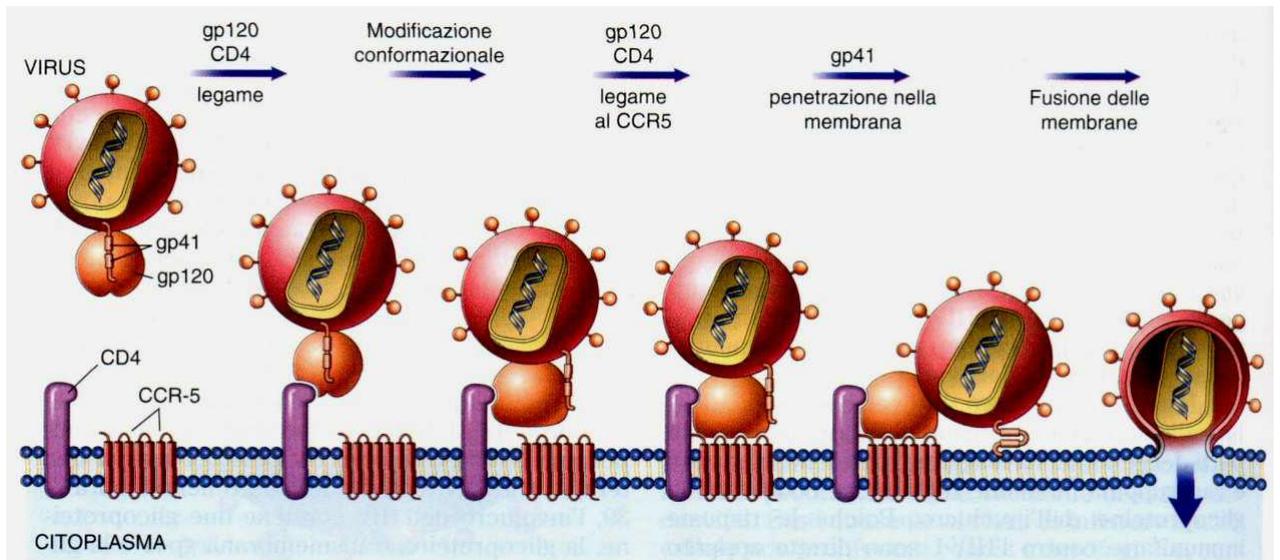


Figura 8. Meccanismi molecolari dell'entrata di HIV nella cellula ospite. Sono illustrate le interazioni con la molecola CD4 ed il corecettore CCR5.

• Replicazione del genoma

Nelle prime sei ore dall'infezione, nel citoplasma delle cellule infettate ha luogo la conversione dell'RNA virale a singola elica a DNA a doppia elica, grazie all'azione concertata di due enzimi virali specifici: la DNA polimerasi RNA-dipendente e la ribonucleasi H. [76, 77]

Una volta avvenuta la trascrizione dell'RNA a DNA, può avere seguito l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite, portando così a termine quel processo noto come *integrazione*, mediato da uno specifico enzima virale denominato appunto *integrasi*, presente nel virione infettante. [76]

Integrato nel genoma della cellula ospite, il DNA virale (a questo punto denominato DNA provirale) rimane permanentemente associato al materiale genetico della cellula, e diviene parte del materiale genetico cellulare finché la cellula sopravvive.

Queste caratteristiche, unite all'evidenza che molto raramente il virus uccide le cellule infettate, garantiscono che, una volta infettato, il paziente rimane infetto per tutta la vita. [28]

L'espressione vera e propria del virus ha inizio con la sintesi di una copia completa del DNA provirale, trascritta però ad mRNA; tali eventi di trascrizione hanno inizio dalle sequenze LTR, che affiancano le sequenze codificanti per le proteine virali.

La trascrizione del DNA provirale è inoltre a sua volta controllata da alcune proteine cellulari, che ne influenzano la velocità di trascrizione in senso positivo o in senso negativo a seconda della natura e dell'attività delle proteine e dei fattori di trascrizione coinvolti nel processo.[28]

È infatti noto che le sequenze promotrici LTR hanno debole azione attivante della trascrizione del genoma virale nelle cellule T, poiché il promotore stesso contiene sequenze che inibiscono attivamente l'inizio della trascrizione [78, 79], ma è anche stato dimostrato che l'attività promotrice viene implementata nettamente nelle cellule T attivate. Questa caratteristica viene spiegata almeno in parte dal fatto che la stimolazione e la conseguente attivazione dei linfociti T comporta l'attivazione di proteine cellulari che, oltre a legarsi alle sequenze LTR accelerando l'avvio della trascrizione, hanno anche la funzione di inattivare quelle proteine che regolano in senso negativo il promotore virale. [80, 81, 82]

In questo senso il promotore all'interno delle sequenze LTR orchestra vari aspetti del ciclo replicativo virale, che vanno dalla replicazione attiva fino all'instaurarsi dello stato di latenza. Le fluttuazioni stocastiche dell'espressione genica virale, amplificate a loro volta dall'azione transattivante di *tat*, contribuiscono anch'esse a determinare lo stato di infezione produttiva, di transattivazione o di latenza. [28, 83]

Il ruolo della proteina transattivante *tat*, (i geni vanno corsivati le proteine no) consistente fondamentalmente nella stabilizzazione dell'interazione tra l'RNA-polimerasi e i geni virali durante la trascrizione degli stessi. Ulteriore ruolo della proteina *tat* consiste nella sua capacità di aumentare ulteriormente la frequenza dell'avvio della trascrizione genica. [28, 84]

L'RNA trascritto a partite dal DNA virale contiene numerosi siti di splicing, che vengono riconosciuti dagli apparati di *splicing* presenti nella cellula ospite; una volta sottoposti agli eventi di *splicing*, gli mRNAs virali vengono traslocati dal nucleo al citoplasma cellulare, dove subiscono gli eventi di traduzione.

Tra i prodotti della traduzione operata a livello citoplasmatico si riconoscono tat e le altre due proteine regolatrici rev e nef.

Come la proteina tat, anche rev è localizzata primariamente all'interno del nucleo e del nucleolo delle cellule infette, e il suo legame alle sequenze di RNA modifica lo splicing del trascritto primario. [28, 85, 86, 87]

In particolare in assenza di rev si accumulano nel citoplasma solo piccoli mRNAs *multispliced*, mentre in sua presenza si accumulano nel citoplasma soltanto RNA completi o sottoposti a un singolo *splicing*. Dalla traduzione degli RNA che non hanno subito processi di *splicing* o che ne hanno subito un singolo processo, ha luogo la produzione delle proteine del capsido e dell'envelope virale, per cui risulta chiaro come rev sia direttamente implicato nella regolazione dell'espressione di env. [28, 88, 89, 90, 91]

Inoltre, secondo studi effettuati su materiale provirale mutato che non poteva essere sottoposto a *splicing*, rev avrebbe la funzione di stabilizzare i *non-spliced* mRNA, nonché di promuovere il trasporto dal nucleo al citoplasma di mRNA contenenti elementi responsivi alla regolazione da parte di rev stesso; ne deriverebbe quindi un meccanismo di controllo a feedback sui livelli di mRNA virale. [85]

L'mRNA completo, cioè non sottoposto a *splicing*, localizzato nel citoplasma, viene utilizzato come stampo per la sintesi delle proteine capsidiche, ottenute a partire da un precursore poliproteico, e degli enzimi replicativi, ottenuti invece a partire da una proteina di fusione.

In particolare, le proteine del capsido e gli enzimi implicati nella replicazione virale sono localizzati a livello di diverse ma sovrapposte regioni *open reading frame* dell'RNA.

Il risultato finale di questi processi consiste nell'inserimento, a livello della superficie interna della membrana cellulare, dei precursori proteici del capsido e degli enzimi responsabili della sintesi delle proteine capsidiche coassemblati tra loro.

Le glicoproteine dell'envelope virale sono sintetizzate a partire da una catena di RNA messaggero che ha subito un singolo *splicing* e da cui origina un unico precursore glicoproteico. Quest'ultimo viene successivamente indirizzato prima al reticolo endoplasmatico ruvido e successivamente all'apparato di Golgi della cellula ospite, dove viene sottoposto a glicazione da parte di carboidrati complessi e, rispettivamente, a clivaggio in due subunità (denominate gp120 e gp41), nonché all'ulteriore modificazione dei carboidrati complessi. [28]

• **Packaging virale e fuoriuscita del virus**

Le successive tappe degli eventi di maturazione sono mediate dall'azione proteolitica della proteasi virale, la cui azione clivante sulle proteine del capsido e sul precursore proteico degli enzimi replicativi consente un ri-orientamento delle proteine capsidiche allo scopo di ottimizzare la posizione degli acidi nucleici e degli enzimi posti all'interno del capsido stesso; ulteriore azione della proteasi virale nella maturazione del virus stesso consiste nel clivaggio dell'estremità che mantiene il virione legato alla membrana cellulare all'atto del rilascio delle particelle virali mature dalla cellula infettata. [92, 93]

La maggior parte degli eventi finora descritti possono essere, almeno in parte, influenzati dall'attività di alcuni geni responsabili della regolazione tardiva, quali *vif*, *vpu*, *vpr* e *nef*.

Il gene *vif* agisce tardivamente, in particolare facilitando il rilascio della particella virale e aumentandone l'infettività; è stato infatti dimostrato che in assenza di attività di *vif* l'infettività delle particelle virali rilasciate dalla cellula infetta è ridotta, così come risulterebbe diminuita la capacità della cellula stessa di trasmettere l'infezione a cellule altrimenti sane. Ciononostante non c'è dimostrazione della presenza dei prodotti proteici del gene *vif* all'interno dei virioni maturi.

Il ruolo del gene *vpu* si esplica con la sintesi del relativo prodotto proteico denominato *Viral Protein U* (da cui l'acronimo *vpu*), che avrebbe invece lo scopo di favorire l'esportazione delle particelle virali dalla cellula. Inoltre la proteina *vpu* avrebbe secondariamente anche la capacità di rallentare l'effetto citopatico virale.

Ciò può avvenire a causa della diminuzione della concentrazione intracellulare di gp120-gp41, necessarie alla formazione dei sincizi cellulari e implicate nella morte cellulare dovuta al rilascio di virioni maturi, poiché l'esportazione più rapida dei virus impedisce l'accumulo intracitoplasmatico di gp120-gp41. Ne deriva quindi una maggiore longevità della cellula infetta, con la conseguente possibilità di liberare più a lungo virus infettanti.

Come per la proteina vif, anche della proteina vpu non si ha riscontro all'interno dei virioni maturi infettanti. [28, 94]

Ulteriore peculiarità di *vpu* è la mancanza di riscontro della stessa e del suo corrispettivo gene in retrovirus strettamente correlati ad HIV-1 come HIV-2 e SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*) [94]

Il ruolo della Proteina Virale R (da cui l'acronimo vpr) consisterebbe nell'accelerare gli eventi di replicazione virale e nell'indurre arresto del ciclo cellulare e apoptosi.

Vpr arresta il ciclo cellulare in fase G2, fase durante la quale le sequenze LTR sono trascrizionalmente più attive, comportando in tal modo un aumento della replicazione virale. È stato inoltre dimostrata la capacità di vpr di aumentare fino a 10-20 volte l'espressione dei geni del DNA virale non integrato - che si credeva essere solo una sorta di precursore inattivo della forma provirale -, in particolare nei ceppi di HIV-1 difettivi dell'enzima integrasi, nei quali permetterebbe quindi di sintetizzare una certa quota di prodotti virali che contribuiscono alla prosecuzione della replicazione virale. [28, 95]

Infine, *vif* sembrerebbe ritardare gli eventi virali precoci che seguono l'infezione, agendo negativamente sulle sequenze LTR e contribuendo in questo modo a conferire invece stabilità all'infezione latente. [28]

1.5 LE CELLULE BERSAGLIO DI HIV

L'identificazione dei tessuti e dei liquidi biologici suscettibili all'infezione è stata di fondamentale importanza nello studio dei meccanismi patogenetici di HIV-1. Il principale veicolo di infezione del virus è rappresentato da alcuni liquidi biologici quali sangue, emoderivati, sperma e secrezioni vaginali.

In tali materiali il virus è stato osservato sia in forma integrata nelle cellule sia in forma libera [66]. Da segnalare inoltre la trasmissione di HIV da madre sieropositiva al bambino per passaggio transplacentare durante la gravidanza, durante il passaggio nel canale del parto e l'allattamento [96].

Il primo evento condizionante l'infezione della cellula bersaglio è il legame ad alta affinità della glicoproteina gp120 dell'envelope virale con la molecola CD4, antigene di superficie espresso da una sottopopolazione linfocitaria, i linfociti T-*helper* [97].

Nonostante queste cellule rappresentino il target elettivo di HIV, la capacità infettante del virus è stata dimostrata *in vitro* anche per altri elementi cellulari appartenenti allo stipite monocitico-macrofagico ed esprimenti l'antigene CD4, quali monociti del sangue [98], cellule di Langerhans nel derma [99], cellule dendritiche follicolari dei linfonodi [100], macrofagi alveolari nei polmoni [101], le cellule retiniche [102] e quelle della cervice uterina [103]. In queste linee cellulari sono stati riscontrati bassi livelli di replicazione virale e scarso effetto citopatico, a differenza di quanto accade nei linfociti T CD4 positivi infettati: i monociti-macrofagi costituiscono, quindi, il serbatoio virale e il veicolo di diffusione dell'infezione in tutto l'organismo [104].

La capacità di infettare distinte popolazioni bersaglio (esprimenti l'antigene CD4) in differenti fasi dell'infezione, ha permesso di suddividere gli isolati virali in macrofagotropici (M-tropici) e linfocitotropici (T-tropici). I primi replicano nei macrofagi e nei linfociti T (PBMCs, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), mentre i virus primari linfocitotropici mostrano affinità selettiva per i soli linfociti T e possono essere adattati ad infettare linee cellulari T trasformate (TCL) [105, 106, 107].

Studi sperimentali hanno dimostrato l'esistenza di ceppi virali con duplice tropismo, ovvero con la capacità di crescere sia in PBMCs che in TCL [108].

Esiste una considerevole sovrapposizione fra il tropismo cellulare e il fenotipo virale sincizio-induttore (SI), ovvero la capacità citolitica del virus di indurre in coltura la formazione di sincizi cellulari (aggregati di cellule con fusione delle membrane plasmatiche): generalmente i virus M-tropici sono non sinciziogenici (NSI), mentre i T-tropici sono sinciziogenici (SI).

Evidenze sperimentali hanno inoltre dimostrato *in vitro* la suscettibilità all'infezione da HIV di linee cellulari CD4 negative, quali linfociti CD8 positivi, eosinofili, cellule *natural killer* (NK), linfociti B, megacariociti, cellule stromali di timo e di midollo osseo, fibroblasti, astrociti, oligodendrociti e cellule microgliari del sistema nervoso centrale, cellule epiteliali renali, trofoblasti e cellule parenchimali di cuore, muscolo, fegato, surrene e ghiandole salivari [109]. Ciò suggerisce l'esistenza di recettori alternativi all'antigene di superficie CD4, quali galattosil cerebroside, CD44, CD26, LFA-1, antigeni MHC-1 e MHC-2 e molecole ancora ignote.

L'importanza clinica dell'infezione *in vitro* di queste linee cellulari è al momento oggetto di discussione, in quanto le uniche cellule dimostratesi inequivocabilmente infettate *in vivo* rimangono i linfociti T CD4 positivi e gli elementi cellulari dello stipite monocitico-macrofagico.

1.6 VARIABILITÀ GENETICA DI HIV

Tra le caratteristiche peculiari del virus HIV-1 si annovera la sua estrema variabilità genetica [110], espressa non solo in ceppi virali prelevati da soggetti distinti, ma anche in filamenti costituenti il genoma virale ottenuti da singoli individui nel corso dell'infezione. Ogni isolato virale non rappresenta quindi un'unica entità genetica, bensì un insieme di microvarianti altamente correlate ma distinguibili, a cui è stato attribuito il termine di "quasispecie" [111].

La variabilità genetica è una caratteristica intrinseca del virus, in quanto l'enzima Trascrittasi Inversa possiede una delle più alte frequenze di errore descritte in natura (3×10^{-5} nucleotidi/ciclo replicativo), mancando della capacità di riparazione del DNA provirale (*proofreading*) [112, 113].

Le mutazioni, comprendenti sostituzioni, inserzioni e delezioni, potrebbero interessare potenzialmente ogni nucleotide della sequenza virale, in ragione dell'elevato turnover di replicazione (10⁸-10¹⁰ nuove particelle/die).

Tuttavia l'analisi genetica condotta su differenti isolati di HIV-1 mostra una distribuzione non uniforme delle frequenze di errore all'interno del genoma provirale [114]: il gene *env*, codificante le glicoproteine di superficie, sembra maggiormente soggetto a mutazioni, con un tasso di cambiamento pari a 10^{-3} sostituzioni nucleotidiche per sito per anno.

Nonostante l'elevata variabilità, gp120 e gp41 contengono regioni altamente conservate, i residui cisteinici C1-C4, necessarie per mantenere un'adeguata configurazione tridimensionale delle proiezioni sull'involucro lipoproteico. Le mutazioni sono quindi concentrate nelle cinque regioni ipervariabili V1-V5, delle quali V3 corrisponde al principale epitopo in grado di evocare la produzione di anticorpi neutralizzanti. Questi dati suggeriscono l'esistenza di una pressione di selezione positiva in favore di modificazioni non silenti delle glicoproteine di superficie gp120 e gp41, come strumento per eludere la risposta immunitaria dell'organismo [115].

Le analisi di sequenza di ceppi isolati da individui infetti indicano un ulteriore meccanismo nel processo di ricombinazione genica, implicato nella genesi della diversità virale *in vivo*: la presenza di differenti sottotipi di HIV-1 nelle cellule di un medesimo paziente, facilita gli scambi di materiale genetico durante la retrotrascrizione. [116]

Il pattern globale della variazione di HIV-1 è probabilmente determinato da casualità negli spostamenti del virus: i genotipi riconosciuti sono essenzialmente equidistanti nell'albero filogenetico e sembrano derivare da un ipotetico progenitore comune. Il 50% circa di tutti i ceppi individuati appartiene al sottotipo B, predominante in Europa e nelle Americhe; in Africa oltre il 75% degli individui infetti è portatore dei genotipi A, C, D ed E. Tuttavia queste frequenze relative non riflettono accuratamente le proporzioni della prevalenza mondiale, data la sottostima dei ceppi di HIV-1 nei paesi in via di sviluppo.

La variabilità genetica conferisce agli isolati virali molte caratteristiche biologiche e patogenetiche peculiari, come il tropismo, la capacità di indurre un marcato effetto citopatico, di eludere la risposta immunitaria e la pressione farmacologica [116,117].

Il rapido cambiamento del virus in ogni ospite può quindi contribuire alla natura prolungata e progressiva dell'infezione, promuovendo l'esaurimento del sistema immunitario e la comparsa di varianti resistenti alle terapie farmacologiche convenzionali. [27]

1.7 CLASSIFICAZIONE DELLE FORME GENETICHE DI HIV

Sulla base dell'analisi filogenetica di sequenze parziali dei geni *gag* ed *env* è stato possibile distinguere diversi sottotipi di HIV-1 e ipotizzare l'esistenza di un medesimo progenitore per tutti i sottotipi noti: all'interno del medesimo sottotipo le varianti virali risultano infatti raggruppate tra loro costituendo dei gruppi monofiletici con un nodo comune. Con l'analisi dell'intero genoma sono stati in seguito identificati nuovi ceppi di HIV-1 e di Forme Circolanti Ricombinanti (CRF).

È stata quindi necessaria una revisione della tassonomia di HIV-1 e l'introduzione di linee guida internazionali per una corretta e condivisa nomenclatura:

Classificazione	Definizione	Esempi
Sottotipo o <i>clade</i>	Ceppi di HIV-1 equidistanti tra loro, con distribuzione filogenetica a stella piuttosto che ad albero.	A, B, C, D, F, G, H, J e K.
Sotto-sottotipo	Distinti <i>lineage</i> all'interno di un sottotipo; la distanza genetica tra di essi è circa la metà rispetto a quella tra i sottotipi.	I sottotipi A ed F sono ulteriormente divisi in A1, A2, A3, A4 e F1, F2 rispettivamente. La maggior parte di essi circolano in Africa centrale e orientale.
<i>Intersubtype recombinant forms</i>	Ceppi con mosaicismo formato da frammenti provenienti da più sottotipi che si alternano lungo il genoma.	Comuni in aree dove più sottotipi co-circolano. Derivano da eventi di superinfezione o

		coinfezione.
<i>Circulating recombinant forms</i>	Specifiche forme ricombinanti che si diffondono nella popolazione; vengono definite tali quando identificate in almeno tre individui non epidemiologicamente correlati; il nome contiene il numero progressivo di identificazione ed i sottotipi che la compongono; cpx (<i>complex</i>) viene utilizzato per le forme che contengono tre o più sottotipi.	Fino ad ora ne sono state descritte 55.
<i>Unique Recombinant forms</i>	Forme ricombinanti caratterizzate in un singolo individuo.	In numero imprecisato, descritte sulla base di sequenze genomiche complete o parziali. Il loro potenziale nella pandemia è sconosciuto.
<i>Lineage geograficamente distinti</i>	<i>Lineage</i> specifici associati ad alcune regioni che sono distinguibili filogeneticamente; al contrario dei sotto-sottotipi non sono equidistanti all'interno di un sottotipo.	B Thai, C indiano, D Africa occidentale vs. orientale e FSU-A (<i>Former Soviet Union</i>)

Nella classificazione attuale, [118] vengono riconosciuti tre gruppi filogenetici di HIV-1:

M (*Major*), O (*Outlier*) e N (*Non-M, Non-O o New*), ai quali recentemente si è aggiunto il gruppo P (isolato nel 2009 da una donna camerunense residente in Francia).

Il gruppo M sostiene la maggioranza delle infezioni. I virus del gruppo O sono limitati alle popolazioni che vivono in Paesi dell'Africa centrale o epidemiologicamente correlate ad esse, in particolare il Camerun e i paesi limitrofi; tuttavia anche in queste aree rappresentano una minoranza delle infezioni. Attualmente sono stati osservati solo pochi casi di infezione riconducibili al gruppo N, tutti documentati in Camerun. All'interno del gruppo M si riconoscono nove sottotipi (A, B, C, D, F, G, H, J e K), ritenuti originari dell'Africa centrale. Sulla base del sequenziamento dell'intero genoma dei sottotipi, il ceppo inizialmente descritto come sottotipo E è stato riconosciuto essere una forma ricombinante fra A e E e quindi nominato CRF01_AE.

Un ceppo E puro non è mai stato isolato; si può ipotizzare che esso sia esistito in passato e che successivamente, in seguito a selezione o eventi di ricombinazione, si sia estinto lasciando porzioni del ceppo parentale all'interno dei ricombinanti. Alcuni studi inoltre mettono in dubbio l'origine ricombinante della CRF01_AE, ipotizzando una divergenza genetica dal ceppo A dovuta ad un'elevata frequenza di mutazione della regione *env*; secondo tale ipotesi il ceppo ricombinante dovrebbe essere più correttamente considerato un sotto-sottotipo A o lo stesso ceppo ancestrale E. [119]

Anche il sottotipo I, inizialmente classificato sulla base di un numero limitato di sequenze del gene *env*, è risultato essere un ricombinante di tre sottotipi (A, G e I) sulla base dell'analisi dell'intero genoma ed è quindi stato ridefinito CRF04_cpx (*complex*). Tuttavia una successiva e più accurata analisi ha evidenziato che questa CRF presenta un'organizzazione genomica di complessità unica, in cui il ceppo I non è più rappresentato e che comprende regioni di almeno quattro distinti sottotipi (A, G, H e K) oltre a regioni non classificabili. [120]

I sottotipi rappresentano linee evolutive di HIV che hanno raggiunto una notevole divergenza genetica e spesso hanno una certa associazione con specifiche aree geografiche. Negli alberi filogenetici sono rappresentati da gruppi equidistanti tra loro, con una distanza evolutiva pari al 25-35% calcolata sulle sequenze aminoacidiche codificate dal gene *env*.

All'interno dei sottotipi A e F si distinguono due distinti sottogruppi, denominati sotto-sottotipi, A1, A2, A3, A4 e F1, F2 ciascuno dei quali risulta più strettamente correlato all'altro sotto-sottotipo che ad un diverso sottotipo.

Anche i sottotipi B e D sono maggiormente correlati tra loro di quanto non lo siano con gli altri, essendosi probabilmente evoluti dallo stesso ceppo progenitore. All'analisi filogenetica risultano, infatti, essere poco divergenti e dovrebbero essere più correttamente definiti sotto-sottotipi B1 e B2. Tuttavia, per non generare confusione, la designazione di sottotipo D è stata mantenuta nella nomenclatura.

Infine, dalla topologia degli alberi filogenetici è possibile rilevare, all'interno di alcuni sottotipi, raggruppamenti geograficamente localizzati che hanno un progenitore comune. Ad esempio, all'interno del sottotipo C si distinguono varianti locali su base geografica ovvero i ceppi sudafricani, indiani, etiopi e sudamericani; tra i G identificati in Europa, è possibile distinguere gli spagnoli dai portoghesi, [121,122,123] tra gli isolati di sottotipo B si riconosce un raggruppamento dei ceppi thailandesi.

Un nuovo sottotipo, per essere definito tale, deve essere valutato sulla base della sua intera sequenza e deve essere identificato almeno in tre soggetti epidemiologicamente non correlati tra loro. Recentemente è stato individuato e sequenziato l'intero genoma di un nuovo ceppo, provvisoriamente definito come sottotipo U, che essendo stato isolato unicamente in due soggetti, non può ancora essere considerato come il decimo sottotipo di HIV-1, non essendo soddisfatte le raccomandazioni definite dal Comitato Internazionale per la Nomenclatura di HIV. [124]

Si ritiene che le forme genetiche di HIV-1, il cui genoma presenta porzioni che sono filogeneticamente correlate a distinti sottotipi, si siano originate a seguito di eventi di ricombinazione tra distinti sottotipi in soggetti infettati con due o più ceppi virali.

I virus ricombinanti, identificati in almeno tre soggetti epidemiologicamente non correlati tra loro e caratterizzati dopo sequenziamento dell'intero genoma, vengono designati *Circulating Recombinant Forms* (CRF).

Tuttavia, le linee guida definite dalla Commissione Internazionale nominata per la revisione e l'aggiornamento continuo della nomenclatura di HIV, ha stabilito che, anche se tre genomi *full-length* sono preferibili, qualora non fosse possibile ottenere la sequenza completa del

terzo caso, sarebbero sufficienti anche due *full-length* in associazione con sequenze parziali di un terzo soggetto; in quest'ultimo caso le sequenze parziali devono contenere regioni che confermino la struttura a mosaico. Le CRF sono denominate con un numero progressivo che corrisponde all'ordine in cui vengono identificate, seguito dalle lettere dei sottotipi parentali (U indica le porzioni non classificabili) o da cpx (*complex*) per i ricombinanti che comprendono più di due sottotipi.

Ad oggi sono state identificate per HIV-1 55 CRF [125,126,127,128] (Figura 9), che, generalmente, sono geograficamente localizzate. Per la maggior parte di esse è stata pubblicata la caratterizzazione molecolare della struttura ricombinante; resta da chiarire il pattern di alcune di cui sono disponibili in rete le sequenze. Recentemente è stata inoltre identificata la prima CRF di HIV-2 (CRF01_AB). [129] La maggior parte delle CRF ha origine africana, tuttavia alcune si sono originate fuori dall'Africa, in aree dove i ceppi parentali cocircolano ad alta prevalenza.

E' il caso del gruppo di CRF con pattern di ricombinazione BF di origine sudamericana (CRF17_BF, [130] CRF28_BF, [131] CRF29_BF, [132] CRF38_BF, [133] CRF39_BF, CRF40_BF, [134] CRF44_BF, CRF44_BF, [135] CRF46_BF), [136] di cui la CRF12_BF, [137,138] oggi diffusa in tutto il mondo, rappresenta la prima identificata. Di recente identificazione, la CRF47_BF è la prima CRF con pattern BF ad essere stata identificata al di fuori del Sud America (Spagna). [139]

Di recente identificazione sono anche i mosaicismi cubani quali la CRF18_cpx, [140] la CRF19_cpx, [141] la CFR20_BG, la CRF23_BG e la CRF24_BG. [142]

La distribuzione globale delle differenti forme di HIV-1 è un processo dinamico (Figura 9). La probabilità di rilevare nuove forme ricombinanti aumenterà all'aumentare delle varianti di HIV-1 che cocircolano nella stessa area. Alcune tra le nuove CRF isolate vengono definite di seconda generazione, a causa di una sempre maggior complessità dei mosaicismi che coinvolgono ceppi virali che sono a propria volta delle forme mosaiche, come avvenuto per la CRF15, [143] la CRF33, [144] la CRF34, [145] CRF48, [146] la CRF51, [147] la CRF52, la CRF53, la CRF54 isolate in Malesia, la CRF22 di origine africana che coinvolgono la CRF01, e per la CRF32 [148] che coinvolge la CRF06. [149] Virus mosaici contenenti la CRF02_AG sono la CRF36 [150] e CRF37, entrambe di origine africana, e la CRF 43, [151] di origine araba.

In diversi studi di sorveglianza è stato rilevato che l’impatto delle CRF nella pandemia globale di HIV-1 è in notevole aumento, rappresentando il 20% delle nuove infezioni. [152]

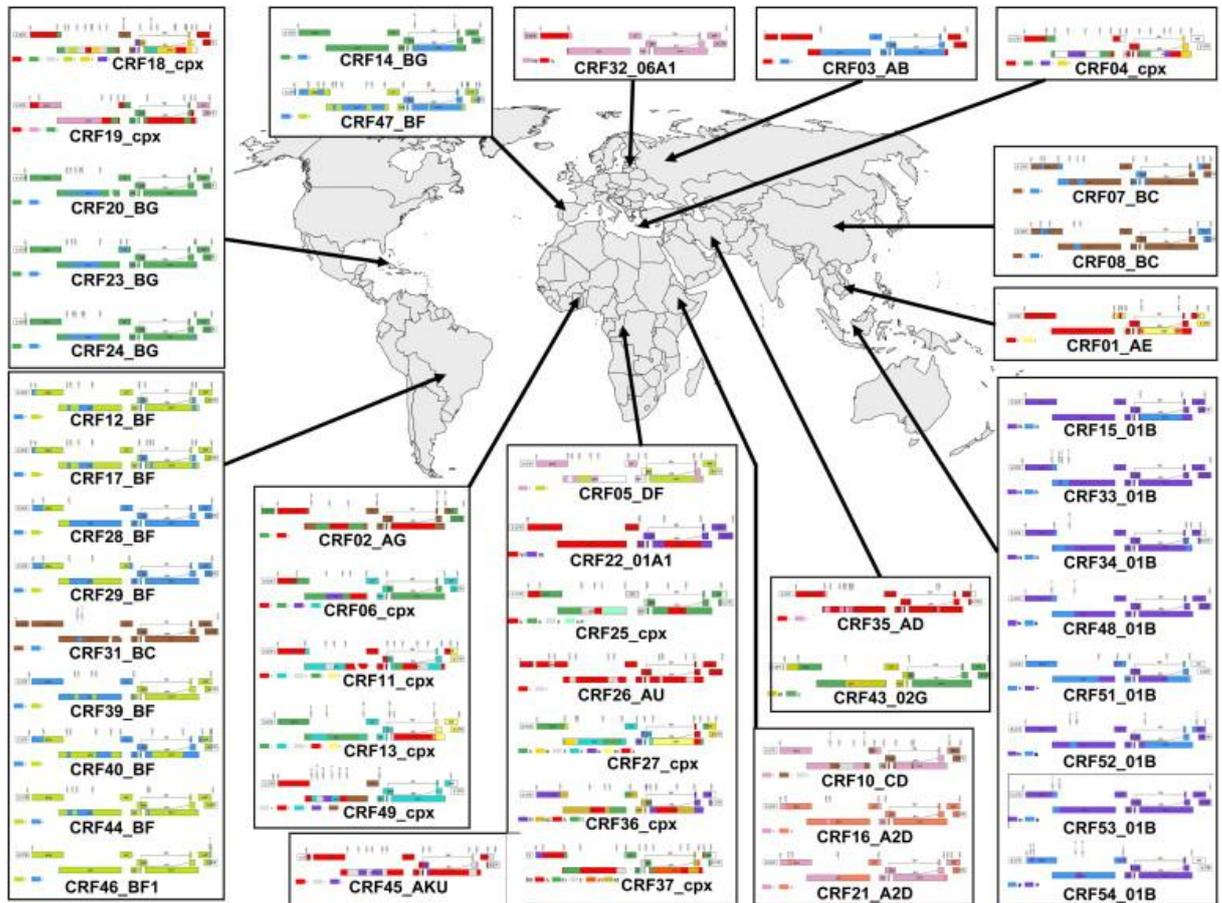


Figura 9. Diffusione globale delle forme circolanti ricombinanti di HIV-1 e i loro pattern di ricombinazione (*Fonte: Hemelaar 2012*)

1.8 PATOGENESI DELLA MALATTIA

1.8.1 Vie di trasmissione

La via più comune di trasmissione dell’HIV-1 è quella sessuale: omosessuale ed eterosessuale. HIV può potenzialmente attraversare la barriera mucosa attraverso numerose vie, tra cui: l’infezione diretta delle cellule epiteliali, la disseminazione tramite la migrazione intraepiteliale delle cellule di Langherans o direttamente attraverso soluzioni di

continuo della mucosa stessa, dovuta ad ulcerazioni o microabrasioni (via parentale in apparente). Un altro tipo di trasmissione è quella verticale che si verifica in circa un terzo delle gravidanze con madre infetta nei Paesi in via di sviluppo, e dal 15 al 25% nei Paesi industrializzati. Nei casi in cui si verifica la trasmissione dell'infezione, questa avviene per il 23-30% in utero, per il 50-65% intrapartum e per il 12-20% durante l'allattamento.

L'infezione da HIV viene tradizionalmente distinta in tre fasi: infezione primaria, fase di latenza clinica e sindrome da immunodeficienza.

L'infezione primaria ha un periodo di incubazione abbastanza lungo, una sintomatologia ancora non del tutto chiara ed una fase viremica prolungata. La fase di latenza clinica o silente rimane ancora un punto oscuro. La sua durata è inversamente proporzionale all'entità della replicazione virale. La progressione verso la fase clinica è tanto più rapida quanto più è alta la quantità di virus (HIV-RNA) nel plasma. Inoltre, l'aggravamento della situazione immunologica è correlata ad un ulteriore aumento della viremia. Il declino di quest'ultima derivato dalla somministrazione dei farmaci antivirali, è seguito da un ripristino della funzione immunitaria proporzionale alla caduta di virus. Gli stadi che definiscono l'infezione acuta e precoce da HIV-1 sono caratterizzati dalla presenza di marcatori virali ed anticorpi nel sangue. Da un punto di vista virologico, l'infezione acuta è caratterizzata da una spiccata replicazione virale, associata a elevati livelli di viremia plasmatica ($>10^6$ copie di HIV-RNA/ml), responsabile della disseminazione del virus a livello degli organi linfoidi. Man mano che ciascuno dei *markers* compare nel circolo ematico, l'infezione viene assegnata a un diverso stadio:

- Stadio 0** (periodo di eclissi, caratterizzato da *marker* virali non rilevabili nel sangue, di durata stimata in media fino a 11 giorni dopo l'esposizione)
- Stadio I** (viremia definitiva di HIV-RNA)
- Stadio II** (comparsa dell'antigene p24 nel sangue)
- Stadio III** (anticorpi specifici per le proteine ricombinanti di HIV, rilevati con metodo ELISA)
- Stadio IV** (Western Blot indeterminato "I")
- Stadio V** (Western Blot positivo senza la banda p31, "P*")

□ **Stadio VI finale** (Western Blot positivo “P”, completo di banda p31). La sierconversione può essere accompagnata nel 40-90% dei casi da un corredo sintomatologico aspecifico, tuttavia così modesto da condurre raramente il paziente all’attenzione medica.

Tra i sintomi vi possono essere febbre, affaticamento, linfadenopatia con linfomegalia, rash evanescente, cefalea, faringite, artro-mialgie, sudorazioni notturne, ulcere genitali, sintomi gastrointestinali, fino a rari casi di meningite asettica.

1.8.2 Specificità della risposta anticorpale autologa

Lo sviluppo della risposta anticorpale autologa nel corso dell’infezione acuta da HIV è diventato oggetto di crescente interesse,. L’apparizione degli anticorpi neutralizzanti autologhi (NAb) avviene nella maggior parte dei casi nel giro di mesi dall’infezione e mentre queste risposte sono spesso potenti e guidano la fuga dalla neutralizzazione, sono estremamente specifiche contro i singoli ceppi virali. La prima risposta delle cellule B alla trasmissione di HIV-1 comprende anticorpi che si sviluppano nei primi 8 giorni di viremia rilevabile come complessi antigene-anticorpo [153] Questi sono seguiti a distanza di 5 giorni da anticorpi circolanti anti-gp41 e successivamente da anticorpi anti-gp120, diretti contro l’ansa V3, ritardati di circa 14 giorni. Le risposte anticorpali neutralizzanti (NAb) nei confronti di HIV-1 si sviluppano più tardi nel decorso dell’infezione, a circa 12-20 settimane dalla trasmissione, con anticorpi che mostrano un’invariabile specificità per ceppo e che sono stati descritti specialmente nel sottotipo C. [154]

Tali risposte antigene-anticorpo persistono per la maggior parte del corso della malattia, ma possono svanire durante la fase sintomatica dell’infezione, forse riflettendo l’incapacità del sistema immune umorale non più funzionante, di rispondere alle varianti virali *de novo*.

La specificità per ceppo degli anticorpi neutralizzanti e la pressione genetica evidenziata sulle sequenze env più tardive, suggeriscono che questi anticorpi siano indirizzati contro le regioni variabili piuttosto che sulle strutture più conservate di *env*.

La glicoproteina di superficie di HIV-1, env, ha sviluppato meccanismi multipli per evadere la risposta immune umorale dell'ospite, tra cui l'esclusione oligomerica, il mascheramento dei siti di legame per il corecettore e una pesante glicosilazione. Nonostante il suo scudo protettivo, env è un *target* maggiore della risposta umorale nell'infezione da HIV ed evolve rapidamente per sfuggire agli anticorpi neutralizzanti; questo evoca lo sviluppo di nuovi NAbs, conducendo a cicli successivi di produzione anticorpale ed escape da parte del virus. Uno studio longitudinale dell'infezione da HIV dalla sierconversione alla malattia sintomatica ha evidenziato che nella fase iniziale dell'infezione si assiste a un aumento dei siti di N-glicosilazione (PNGS) e della lunghezza complessiva di gp160; durante il corso dell'infezione, ha luogo un declino della selezione positiva e un affievolirsi della risposta anticorpale neutralizzante, che coincide con la reversione dei cambiamenti nella lunghezza di gp160 e nel numero dei PNGS. Questo studio suggerisce che, nonostante l'immunità umorale autologa neutralizzante abbia un peso limitato sul corso dell'infezione, essa rappresenta un'importante pressione selettiva nell'evoluzione virale nella fase iniziale; mentre negli stadi più avanzati si osserva un declino dell'immunità umorale HIV-specifica con la reversione dei cambiamenti in env determinati dagli anticorpi specifici neutralizzanti, fenomeno suggestivo di un effetto di questi cambiamenti sulla fitness virale [155]

Sperimentazioni sulla risposta anticorpale nell'infezione acuta e in volontari sani dopo somministrazione di vaccino indicano che tra i primi anticorpi ad essere sviluppati nell'infezione acuta e recente vi sono alti titoli di anticorpi specifici contro V3 con un ampio spettro di reattività, ma questi anticorpi mancano di potere neutralizzante nei confronti dei virus HIV-1 primari, che effettivamente creano uno scudo per mascherare V3 [156]

Al contrario, vi è una crescente evidenza che la regione V1-V2 sia target precoce di anticorpi neutralizzanti, mentre il ruolo di V4 e V5 è meno chiaro; oltre alle regioni variabili, sembra che anche C3 sia implicata come target di neutralizzazione nei virus di sottotipo C e che sia sottoposta ad una forte pressione selettiva [109,110]

Nel momento in cui viene sviluppata una risposta anticorpale efficace è ormai troppo tardi per influenzare il corso dell'infezione. Anche le prime risposte T cellulari selezionano a cicli ripetuti degli *escape mutants*, che non possono essere riconosciuti dai linfociti citotossici, con una pressochè completa sostituzione da parte della nuova sequenza in 10-21 giorni [157]

1.9 TERAPIA ANTIRETROVIRALE

La gestione medica dell'infezione da HIV è basata sulla terapia antiretrovirale attualmente nota come HAART, Highly Active Antiretroviral Therapy. La HAART è una composizione di tre farmaci antiretrovirali appartenenti ad almeno due diverse classi di farmaci [158, 159].

Dalla sua introduzione, avvenuta nel 1996, tale strategia terapeutica ha portato a significative riduzioni della morbilità e mortalità HIV-correlate.

L'obiettivo della terapia combinata è primariamente la soppressione della carica virale nel plasma e quindi della quantità di virus circolante e secondariamente il ripristino della capacità di risposta immunologica, dimostrata dall'aumento del numero di cellule CD4+ [160].

L'introduzione della HAART ha permesso di rallentare il decorso della malattia dimostrandosi essenziale nel ridurre l'insorgenza di infezioni opportunistiche e neoplasie, principali cause di morte nei pazienti con AIDS.

1.9.1 Classificazione dei farmaci antiretrovirali

I farmaci attualmente utilizzati per trattare l'infezione da HIV tipo 1 appartengono a sei classi distinte in base al sito e al meccanismo d'azione: gli inibitori nucleosidici e nucleotidici della trascrittasi inversa, gli inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa, gli inibitori della proteasi, gli inibitori di fusione, gli inibitori dell'integrasi, gli inibitori dell'entrata.

Gli inibitori della Trascrittasi Inversa e della Proteasi virus-specifica rappresentano i composti farmacologici maggiormente utilizzati nella pratica clinica, in quanto dotati di elevato indice terapeutico e attività antivirale *in vivo* [161].

• **Inibitori nucleosidici e nucleotidici della trascrittasi inversa (NRTI):**

Rappresentano la classe più frequentemente prescritta, sono sempre inclusi nel regime di trattamento iniziale. Durante l'attività di sintesi di DNA a partire da RNA virale dell'enzima trascrittasi inversa, tali farmaci, previa fosforilazione, vengono incorporati nel DNA virale

impedendone la sintesi. La replicazione virale termina quindi precocemente, bloccando l'intero ciclo replicativo del virus e riducendo la possibilità di infezione di nuove cellule bersaglio [160, 162].

Gli inibitori nucleosidici della Trascrittasi Inversa comprendono analoghi della timidina (Zidovudina o ZDV, primo farmaco scoperto e ampiamente utilizzato per la sua buona distribuzione nel sistema nervoso centrale, Stavudina o d4T), della citidina (Zalcitabina o ddC, Lamivudina o 3TC), della adenosina (Didanosina o ddI) e della deossiguanosina (Abacavir, o ABC, mostra ottima biodisponibilità, diffondendo bene nei tessuti e discretamente a livello liquorale) [161]. I principali effetti collaterali di tali farmaci sono legati principalmente, alla loro capacità di inibire le DNA polimerasi γ presenti nei mitocondri degli adipociti umani. La disfunzione mitocondriale generata, provoca come conseguenza un'anomala redistribuzione del grasso corporeo, fenomeno noto con il nome di lipodistrofia [162]. Tale fenomeno si manifesta con riduzione dello strato adiposo al volto e agli arti con un accumulo anomalo a livello retrocervicale, addominale e viscerale, aumento dei trigliceridi, LDL e VLDL, riduzione dei livelli di HDL circolanti, insorgenza di insulino-resistenza e diabete mellito [163, 164].

• **Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI):**

Agiscono sul ciclo replicativo virale allo stesso livello degli NRTI ma, diversamente da questi, non richiedono una fosforilazione intracellulare e non inibiscono le DNA polimerasi mitocondriali.

I farmaci attualmente in commercio in Europa, derivati delle benzodiazepine, sono Nevirapina (NVP) ed Efavirenz (EFV). Essi vengono solitamente prescritti nei regimi terapeutici iniziali poiché si è dimostrato avere una buona efficacia in associazione con due NRTI e perché solitamente richiedono un dosaggio con basso numero di compresse [160].

I principali effetti collaterali sono epatotossicità e rash cutaneo per la Nevirapina e disturbi al sistema nervoso centrale quali insonnia, allucinazioni visive, irritabilità e più raramente psicosi per Efavirenz [165].

- **Inibitori delle proteasi:**

Tali farmaci, inibendo la proteasi virale, prevengono il clivaggio di proteine virali nelle subunità proteiche necessarie per la formazione di nuovi virioni; bloccano quindi la produzione di virus da parte di cellule già infettate.

Saquinavir (SQV), Ritonavir (RTV), Indinavir (IDV), Nelfinavir (NFV), Amprenavir (APV), Lopinavir (LPV), Tipranavir (TPV), Atazanavir (ATV) e Darunavir (DRV) sono le molecole appartenenti alla classe degli inibitori della Proteasi (PI) attualmente utilizzate nella pratica clinica.

Questi farmaci sono dotati di ottima efficacia terapeutica ma interagiscono massivamente con il sistema enzimatico della CYP450 che ne causa la rapida degradazione. Solo Ritonavir, se somministrato a basse dosi, è in grado di inibire tale sistema; esso, nella cosiddetta “terapia potenziata farmacologicamente” viene somministrato a dosi subterapeutiche insieme ad un altro PI proprio per incrementarne la concentrazione sierica e ridurre la necessità di somministrazioni di farmaco frequenti [166].

Anche i PI come gli NRTI sono in grado di interferire con la funzionalità mitocondriale delle cellule adipose, favorendo l’insorgenza di lipodistrofia. Un altro effetto collaterale diffuso è l’insorgenza di disturbi gastrointestinali quali diarrea, nausea, vomito, dispepsia.

- **Inibitori di fusione:**

Enfuvirtide (T-20) è l’unico farmaco di questa classe attualmente in commercio. Esso previene la fusione dell’envelope virale con la membrana cellulare delle cellule bersaglio bloccando l’entrata del virus nelle cellule linfocitarie CD4+.

- **Inibitori dell’integrasi:**

L’unico farmaco appartenente a questa classe di molecole è Raltegravir, approvato dalla Food and Drug Administration nel 2007. [168, 169]

Questo farmaco blocca la formazione dei legami covalenti tra il DNA virale a doppio filamento e il DNA della cellula ospite mediata dall’azione dell’enzima virale integrasi

[168, 169]; viene quindi impedita l'integrazione del genoma virale nel genoma della cellula ospite, impedendo in tal modo un'infezione produttiva.

Il metabolismo di questa molecola avviene principalmente per glicuronidazione epatica. L'uso di Raltegravir è stato approvato in combinazione con altri farmaci antiretrovirali, in pazienti adulti già in trattamento ma con dimostrazione di replicazione virale attiva e di ceppi virali multiresistenti. A causa dell'insorgenza di resistenza in pazienti con storia di fallimenti immunovirologici, è raccomandato l'uso di Raltegravir in combinazione con due o più farmaci che si dimostrino pienamente efficaci. [168, 170, 171, 172, 173]

• **Inibitori dell'entrata:**

Principale rappresentante di questa classe di farmaci antiretrovirali è Maraviroc, il primo antagonista del corecettore CCR5 approvato dalla *Food and Drug Administration*.

Maraviroc è un antagonista specifico e lentamente reversibile, non competitivo, del recettore per le chemochine e corecettore virale CCR5; questa molecola agisce quindi bloccando l'entrata di HIV nella cellula ospite.

È stato dimostrato clinicamente che Maraviroc è in grado di indurre una significativa diminuzione della carica di RNA virale, e un aumento della conta di CD4+ circolanti. [175]

Tuttavia, restano ancora irrisolte importanti problematiche, tra le quali l'insorgenza di resistenza dovuta alla pressione selettiva sull'uso del corecettore virale, che può quindi portare a uno switch del corecettore, da parte di HIV. Ne deriverebbe quindi un'induzione del passaggio al tropismo per il corecettore CXCR4, che è risaputo avere maggiore patogenicità. [176, 177]

Inoltre Maraviroc è un farmaco metabolizzato dal sistema del CYP450, caratteristica che comporta importanti implicazioni per quanto concerne le interazioni con numerosi altri farmaci. [175, 178]

Infine, trattandosi di una molecola con azione di antagonismo nei confronti di un recettore per le chemochine, sussistono delle preoccupazioni per i possibili effetti immunologici e oncologici nel lungo termine. [175]

1.9.2 Resistenze alla terapia antiretrovirale

Il fallimento della terapia antiretrovirale riconosce come causa principale l'emergenza di varianti virali resistenti ad essa. Numerosi fattori contribuiscono alla incompleta soppressione della replicazione dei virioni, tra cui l'assetto genetico e immunitario dell'ospite, la scarsa aderenza a regimi terapeutici complessi, la tollerabilità e la tossicità a lungo termine dei composti farmacologici. Tutto ciò porta alla comparsa di farmacoresistenza, come conseguenza diretta della variabilità del virus HIV-1 [179, 180].

Gli alti livelli di replicazione e l'elevata eterogeneità della popolazione virale in uno stesso soggetto infetto sono alcuni dei principali motivi di fallimento terapeutico [181]. A ciò contribuiscono l'elevata frequenza di errore della Trascrittasi Inversa e la sua incapacità di riparazione del DNA provirale, nonché la pressione selettiva operata dai regimi terapeutici convenzionali che possono favorire l'insorgenza di mutazioni non casuali del genoma virale. Tali mutazioni conferiscono al virus caratteristiche biologiche e patogenetiche peculiari tali da eludere la risposta immunitaria dell'organismo e diminuire la sensibilità del virus alle molecole antiretrovirali [163].

Sottopopolazioni di HIV-1 geneticamente distinte (quasispecie) caratterizzate da resistenza ai composti farmacologici attualmente in uso nella pratica clinica, possono quindi venire selezionate in corso di terapia, oppure essere preesistenti dall'inizio della stessa: la pressione selettiva indotta dall'utilizzo di farmaci antiretrovirali può, in quest'ultimo caso, far emergere varianti resistenti non evidenti in precedenza e in grado di mantenere un elevato turnover di replicazione [182].

La rapidità del processo di resistenza farmacologica dipende dall'entità dei vantaggi selettivi conferiti al virus dalle mutazioni, dalla prevalenza di un determinato mutante all'interno della popolazione virale e dalla quantità di farmaco inibente la proliferazione del virus. Solitamente per indurre alti livelli di resistenza è necessario un graduale accumulo di singole mutazioni, sebbene si siano osservati casi in cui la sostituzione di un singolo aminoacido ha prodotto mutanti altamente resistenti nel giro di alcune settimane [163].

Studi sperimentali hanno evidenziato l'esistenza di mutazioni primarie e secondarie nella genesi della farmacoresistenza, differenti per modalità e tempo di insorgenza.

Le mutazioni primarie interessano le sequenze codificanti il sito catalitico dell'enzima virale, emergono precocemente e sono essenziali per lo sviluppo della resistenza. Le mutazioni secondarie sono a carico di regioni adiacenti al sito attivo, seguono cronologicamente le primarie e rappresentano l'adattamento del virus alla pressione farmacologica. Si può spiegare la buona efficacia di una terapia combinata considerando la necessità di più mutazioni per generare resistenza a tutti i farmaci in regime e che questi, agendo contemporaneamente su più siti di replicazione, inibiscono massivamente la proliferazione virale e riducono, quindi la probabilità d'insorgenza di nuove mutazioni [158, 159].

Le metodiche di studio delle resistenze virali consistono principalmente in test genotipici e fenotipici. I test genotipici sono i metodi più comunemente usati in clinica; si basano sul sequenziamento del genoma virale e sull'analisi delle mutazioni aminoacidi che rilevate in esso. Essi permettono inoltre di individuare mutazioni sporadiche nella popolazione virale prevalente, incapaci di dare resistenza rilevabile a livello fenotipico, ma indicative di pressione farmacologica selettiva. I test fenotipici di resistenza si identificano, invece, con la determinazione della suscettibilità di isolati virali a molecole farmacologiche definite.

1.10 TROPISMO DI HIV-1

Il tropismo virale può essere definito come la capacità di HIV-1 di infettare specifiche cellule ospiti ed è basata sulla capacità di legame del virus con uno o entrambi i corecettori (CCR5 o CXCR4) presenti sulla superficie cellulare. Tutti i ceppi di HIV-1 infettano e replicano in linfociti T CD4+ primitivi attivati;. I virus che mostrano un'affinità specifica nei confronti di CXCR4 possiedono un livello di infettività estremamente efficiente per linee di linfociti T CD4+ a qualunque stadio maturativo ma molto ridotto per i macrofagi primitivi; essi sono denominati T-tropici o X4 tropici, sono generalmente sincizio-induttori e rivelano un maggiore effetto citopatico in vitro [183]

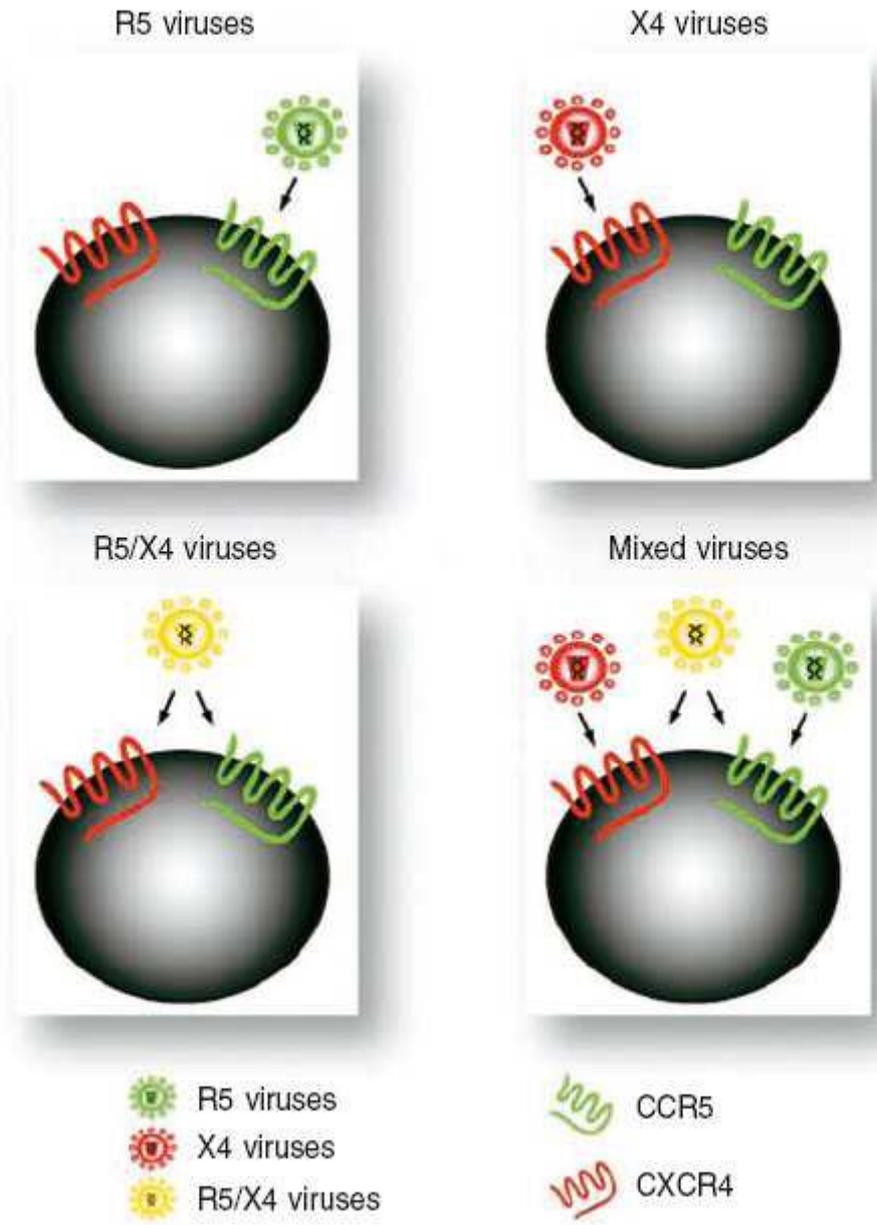


Figura 10. Differenti possibilità di HIV nell'utilizzare i corecettori cellulari (tropismo) in vivo.

1.10.1 Virus X4 T-cell tropici

E' ancora poco chiaro se varianti del corecettore CXCR4 vengano selezionate al momento della trasmissione, se possano replicare attivamente solo in un ospite con immunodeficienza e se rappresentino la causa o la conseguenza della rapida progressione della malattia. Qualche decennio fa, i virus X4 erano concepiti come varianti più patogeniche degli R5 e si pensava comparissero tardivamente nel corso della malattia. Questo derivava dalla loro capacità di indurre la formazione di sincizi. Tale affermazione fu in parte smentita dall'osservazione che alcuni ceppi R5-tropici possono crescere in linee di linfociti T immortalizzati e causare la formazione di sincizi se il CCR5 è espresso. La maggior osservazione del cambiamento fenotipico da R5 a X4 è la comparsa di amminoacidi basici (carichi positivamente) nelle posizioni 11, 24 e 25 di V3 [184, 185, 186] .

D'altra parte, la variabilità complessiva della regione V3 è maggiore quando sono presenti delle mutazioni nei suddetti residui, suggerendo che esse siano il risultato di un processo evolutivo più articolato. E' noto che, lo *switch* da tropismo R5 a X4 è dovuto a cambiamenti di sequenza anche in altre regioni di Env [187]

1.10.2 Virus R5 linfocito-tropici (*T cell-tropic*)

I linfociti T CD4+ attivati sono la principale fonte di replicazione di HIV-1[188]. Le cellule T vengono attivate nell'ambito della risposta immune e il loro rapido metabolismo rende la replicazione virale più efficiente. Queste cellule sono generalmente infettate dal ceppo virale che viene trasmesso, che persiste nell'ospite per anni e che molto spesso causa immunodeficienza. Il fenotipo di questi virus è CCR5 e l'ingresso nella cellula target è garantito da elevati livelli di espressione di CD4 nel linfocita.

1.10.3 Virus R5 macrofago-tropici (*M-tropic*)

Alcuni isolati virali che replicano nei linfociti T CD4⁺ possono infettare anche i macrofagi.[189] I macrofagi agiscono come i maggiori reservoirs per HIV-1 nei tessuti. [190, 191]. Il primo isolato M-tropico è stato Ba-L un clone virale comunemente utilizzato in laboratorio. I virus M-tropici sono stati spesso isolati nel cervello di pazienti HIV⁺ con disordini neurocognitivi, così come nel liquido cerebrospinale; in questi siti, i virus M-tropici giocano un ruolo diretto nella patogenesi. I linfociti T, invece, sono assenti nel sistema nervoso centrale, ma in caso di infiammazione possono essere richiamati ad attraversare la membrana emato-encefalica e diventare fonte di attiva replicazione per i ceppi R5.

I ceppi virali M-tropici sono in grado di infettare cellule con bassi livelli di CD4, che normalmente viene meno espresso nei macrofagi rispetto ai linfociti T attivati.

I ceppi R5X4 possono utilizzare entrambi CCR5 e CXCR4, con la conseguente capacità di infezione di tutte queste linee cellulari.

1.10.4 Tropismo e compartimentalizzazione

Il CCR5 è espresso nei linfociti T *memory*, nei linfociti T CD4⁺ attivati ma anche in macrofagi, cellule dendritiche e microgliali. La frequenza delle cellule T *memory* CCR5⁺ è relativamente alta nei tessuti linfoidei associati all'intestino (*gut-associated lymphoid tissues*, GALT). L'espressione di CXCR4, invece, è preponderante nei linfociti T *naïve* e si riduce a seguito del loro differenziamento e attivazione. CXCR4 è anche espresso nei linfociti T CD8⁺, nelle cellule B, nei neutrofili e negli eosinofili. Considerata la diversa espressione dei corecettori nei sottogruppi di cellule T, la replicazione residua di virus R5 e X4-tropici potrebbe avere differente impatto sull'omeostasi dei linfociti T durante la ricostituzione del sistema immunitario.

E' noto che la maggior parte dei pazienti trattati con terapia antiretrovirale ha non detectabile nel plasma e spesso la terapia prevede l'introduzione degli antagonisti del

CCR5. Al fine di caratterizzare il tropismo nel DNA provirale, sono stati quindi condotti alcuni studi che hanno dimostrato che la proporzione di ceppi R5 nel DNA può variare dal 48% nei pazienti pluritrattati al 92% nei pazienti non sottoposti a trattamento farmacologico con infezione primaria [192-193]. Questa proporzione è simile a quella presente nel plasma e, considerato che nei pazienti naïve il tasso di discordanza del tropismo tra RNA plasmatico e DNA è del 4.8-10%, si può concludere che vi è corrispondenza nell'uso del corecettore fra i due compartimenti. Alcuni studi, inoltre, hanno osservato che nei pazienti trattati con ART e con carica virale irrilevabile per lungo tempo, c'è un'evoluzione delle quasi-specie virali nel DNA verso tropismo CXCR4.

1.10.5 Diffusione e reservoirs virali

Si ritiene che i primi target del virus siano le cellule T CD4 e le cellule di Langerhans, ma altre cellule dendritiche possono giocare un ruolo importante. Le cellule della linea monocito-macrofagica sono generalmente meno suscettibili all'infezione da parte dei ceppi di HIV-1 trasmessi per via transmurale, rispetto alle cellule T CD4.

Indipendentemente dalla via di trasmissione e dalle prime cellule ad essere infettate, entro qualche giorno la replicazione virale converge a livello del sistema linforeticolare del tratto gastrointestinale, detto GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*).

Il fenotipo delle cellule infettate con il maggior livello di produttività sembra essere quello delle cellule T CD4 quiescenti, che non esprimono marcatori di attivazione ed esprimono bassi livelli del recettore CCR5. Diverse di queste cellule esprimono recettori per le integrine $\alpha 4\beta 7$ e marcatori di superficie delle cellule Th17 i quali, rilevati anche sulle cellule T raccolte dalla mucosa genitale, potrebbero svolgere un ruolo importante nell'acquisizione di HIV.

La rapida espansione di HIV-1, prima nel GALT e poi a livello sistemico, insieme ad una rapida salita dei livelli di RNA plasmatico, è clinicamente importante in quanto coincide con la distruzione irreversibile dei reservoirs di linfociti T-helper e con lo stabilirsi della latenza

virale (definita come l'integrazione silente del DNA di HIV-1 nel genoma delle cellule T quiescenti), un effetto che ha ostacolato gli sforzi verso un trattamento eradicante.

Differenti meccanismi possono guidare l'evoluzione del tropismo nei *reservoirs* durante la ART e lo *switch* R5-X4 del DNA nei "serbatoi" dell'ospite è un vivo argomento di discussione. Il ripristino del sistema immunitario in risposta alla ART dipende dall'incremento dei linfociti T *naïve*. Queste cellule potrebbero rappresentare un *reservoir* importante nei pazienti infetti con ceppi X4, dal momento che possono esserne facilmente infettate. Il virus presente nei *reservoirs* può comunque replicare a bassi livelli o essere rilasciato sporadicamente; si ipotizza che l'uno, l'altro o entrambi i fenomeni siano all'origine della "viremia residua". I linfociti T *naïve* contribuirebbero a tale fenomeno mediante due meccanismi: da una parte, l'espansione delle cellule T e il rilascio del virus dagli archivi di ceppi X4 potrebbe portare a una progressiva sostituzione del *reservoir* T *memory*; dall'altra, la replicazione residua dei pazienti sottoposti ad ART potrebbe consentire l'evoluzione genetica delle quasispecie e il cambio dell'uso del corecettore.

1.10.6 Tropismo e stadi di infezione

I virus con tropismo R5 vengono rilevati nella maggior parte delle infezioni primarie, mentre i ceppi CXCR4 emergono tardivamente. Per questo, il corecettore CCR5 sembra giocare un ruolo fondamentale nella trasmissione del virus e durante le prime fasi della malattia. Ulteriori dati a supporto di questa teoria derivano dalla scoperta di una mutazione nel gene codificante la molecola CCR5 (CCR5-Δ32) presente nel 10% della popolazione caucasica. L'omozigotità per questa mutazione è pari all'1% anche se è associata alla totale mancanza di espressione della proteina e a resistenza all'infezione da HIV-1. Invece, l'eterozigotità della mutazione è associata a bassi livelli di espressione del CCR5 e a una ridotta progressione della malattia (Figura 11).

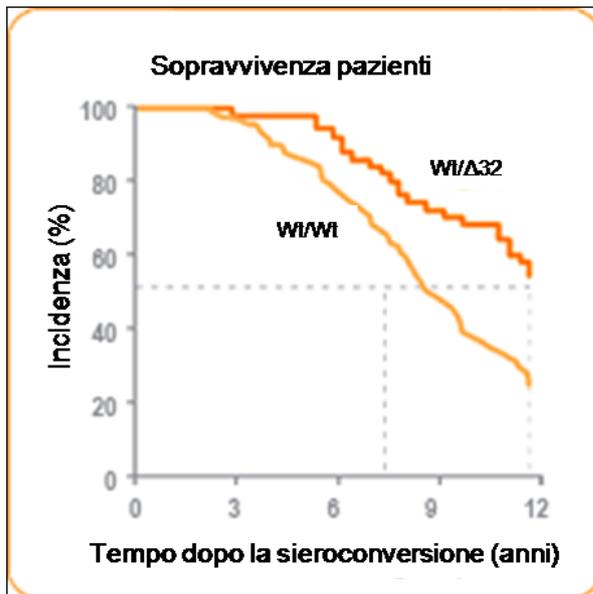


Figura 11. Curva di sopravvivenza dei pazienti con CCR5- Δ 32

La prevalenza nell'uso del corecettore è stata studiata ampiamente anche nei soggetti *naïve* in procinto di iniziare la terapia. Quello che si è notato è che la percentuale di X4 osservata in questo gruppo si aggira intorno al 10% nei pazienti infetti da almeno 4 anni e con un relativamente alto numero di cellule CD4+, mentre nei pazienti in stadio avanzato con CD4<200cell/uL o clinicamente sintomatici, la percentuale di X4 aumenta, oscillando tra il 38% e il 52% [194, 195]. Fra i pazienti con malattia in fase avanzata, la proporzione di virus X4 supera raramente il 50% ; la metà restante è rappresentata da pazienti infettati con ceppi R5-tropici e quindi candidati all'utilizzo di Maraviroc .

In letteratura è riportato che nel corso dell'infezione, le varianti X4-tropiche si evolvono dai virus R5 pre-esistenti. Studi longitudinali con metodiche di sequenziamento ad alta sensibilità (*ultra-deep sequencing*) hanno evidenziato che la transizione R5/X4 segue un percorso che consiste nell'accumulo di mutazioni in regioni coinvolte nel legame al corecettore (principalmente V3) e che ha come risultato il cambiamento del tropismo. Altri lavori hanno dimostrato che le varianti X4 possono essere archiviate nel DNA cellulare già nelle prime fasi dell'infezione e che queste possano riemergere in seguito a pressione selettiva. I pazienti HIV+ che sono andati incontro a *switch* del corecettore mostrano un accelerato aumento della carica virale, riduzione delle cellule T e una rapida progressione verso l'AIDS (Figura 12).

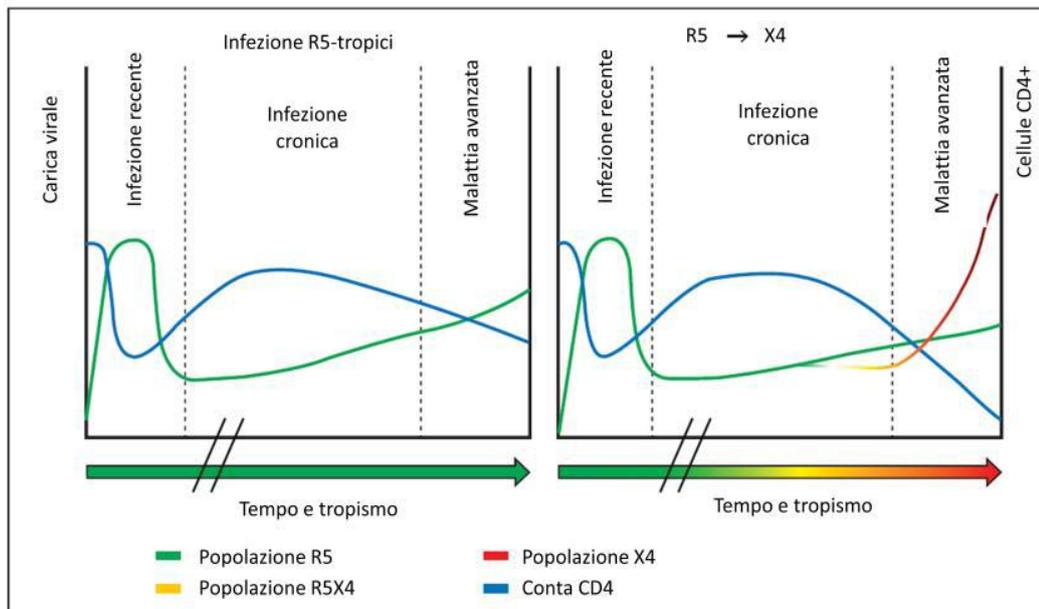


Figura 12. Rappresentazione schematica delle tre fasi di infezione da HIV-1: recente, cronica e avanzata, in relazione all'uso del corecettore. (A) Pazienti infettati con virus R5-tropici mostrano un costante aumento della carica virale e lenta riduzione dei linfociti T CD4+. (B) Pazienti in cui compaiono varianti X4 mostrano rapido aumento della carica virale e declino dei linfociti T CD4+.

I meccanismi alla base dello *switch* sono ancora scarsamente conosciuti e non è chiaro se l'evoluzione verso il tropismo X4 sia causa o conseguenza della progressione della malattia. Fra le varie teorie, si ipotizza che le varianti X4 emergano a seguito della deplezione di cellule immunitarie CCR5+ o di un'aumentata espressione del CXCR4 da parte dei linfociti; entrambi i fattori sarebbero dovuti a un avanzamento della malattia. D'altra parte, è anche plausibile che virus X4-tropici siano meglio riconosciuti immunologicamente rispetto agli R5 tropici, a tal punto da potersi replicare attivamente soltanto in seguito a una significativa compromissione del sistema immunitario, che a questo punto fallirebbe nell'identificarli.

1.10.7 Sistemi diagnostici per la determinazione del tropismo virale.

Come abbiamo detto, per tropismo virale si intende la capacità del virus HIV-1 di entrare in specifiche cellule infettandole, caratteristica basata sulla capacità di legare uno o entrambi i corecettori presenti sulla superficie di queste cellule, CCR5 e CXCR4.

Gli antagonisti del recettore CCR5 (dei quali è attualmente in uso clinico il solo Maraviroc), inibiscono in modo specifico l'entrata nelle cellule ospiti e la conseguente replicazione delle varianti CCR5-tropiche, attraverso un meccanismo allosterico determinato dal legame alla tasca del corecettore CCR5.

La determinazione del tropismo virale è necessaria per l'utilizzo di un antagonista di CCR5 in clinica ed è pertanto raccomandata nelle seguenti condizioni:

In qualunque momento si consideri l'utilizzo di un inibitore del CCR5 (in pazienti naive per terapia antiretrovirale nei quali ci si aspettano degli effetti tossici o per cui vi sono poche opzioni terapeutiche; in pazienti con una bassa tolleranza alla terapia antiretrovirale in corso o con patologia a carico del SNC; in pazienti in cui si consideri un cambiamento di terapia per fallimento terapeutico);

Nei pazienti che mostrano un fallimento virologico in corso di terapia con un inibitore di CCR5. [196,197]

La determinazione del tropismo virale può avvenire tramite due tipi di approcci: genotipico o fenotipico.

La **determinazione fenotipica** caratterizza l'utilizzo del corecettore di virus derivati dal plasma del soggetto infetto. I test fenotipici maggiormente utilizzati sono due:

- Il **test MT-2** consente una determinazione del fenotipo utilizzando il virus intero, attraverso co-coltura di cellule mononucleate dal sangue periferico del paziente e cellule MT-2 esprimenti il solo CXCR4 e dunque passibili di infezione solamente da virus di tipo X4, con formazione di sincizi visibili al microscopio ottico o produzione di antigene virale nel surnatante delle colture.

- Il **test Trofile**, a ciclo singolo, utilizza un virus ricombinante, esprime il gene *env* del paziente, utilizzato per infettare in vitro cellule della linea U87 che ritengono in superficie alternativamente il recettore X4 o R5. Nel caso avvenga l'infezione di una o entrambe le linee cellulari, si rileva un'emissione luminosa quantificabile. Antagonisti del corecettore vengono aggiunti come ulteriore controllo.

Questo test è in grado di rilevare con una sensibilità del 100% le varianti X4 che rendono conto di almeno il 10% della popolazione virale, è costoso, richiede circa due settimane per l'esecuzione e può essere utilizzato solamente su RNA, in pazienti con HIV-RNA plasmatico >1000 cp/mL; dal 2008 è stato sostituito dall'Enhanced Sensitivity Trofile Assay (ESTA), eseguibile su RNA plasmatico e DNA provirale integrato ed in grado di rilevare varianti X4 che costituiscono dallo 0 al 3% della popolazione virale.

Sebbene tale sistema di determinazione del tropismo sembrava essere estremamente promettente e affidabile in quanto fondato sull'osservazione pratica dell'effetto citopatico, esso presenta alcuni importanti limiti. Innanzitutto la fase iniziale di coltivazione del virus a partire da cellule immunitarie del paziente potrebbe selezionare dei ceppi adattati alla replicazione *in vitro* e quindi diversi dal virus prevalente *in vivo*, riducendo in tal modo l'affidabilità del risultato. In secondo luogo, l'analisi delle varianti ottenute dai PBMCs potrebbe non riflettere le caratteristiche della popolazione virale presente nel compartimento plasmatico, dando origine a dubbi sulla possibilità di ottenere effetti benefici dall'utilizzo del *Maraviroc*. Inoltre, il saggio sulle MT2 non distingue fra ceppi X4 puri e DM-tropici, in quanto entrambi presentano lo stesso fenotipo *syncitium-inducing*. Infine, i lunghi tempi di incubazione delle MT2 e, di conseguenza, dell'esecuzione del test ne limitano fortemente l'utilizzo nella pratica clinica.

I saggi basati sulla produzione di pseudovirus sono stati sviluppati per evitare la selezione di ceppi indesiderati nelle fasi di coltivazione *in vitro*. Gli pseudovirus vengono ottenuti con le sequenze di Env amplificate dal plasma del paziente e sono utilizzati per infettare cellule *reporter*. La produzione di questi virioni si ottiene trasfettando cellule epiteliali note come HEK293 con il vettore di espressione di Env insieme a un vettore Env-difettivo, ma contenente un gene per la luciferasi. Gli pseudovirus prodotti vengono quindi utilizzati per inoculare cellule *reporter*, quali la linea U87 derivante da cellule di glioma umano.

I trials clinici sugli antagonisti del CCR5 si sono basati sulla determinazione del tropismo di HIV-1 attraverso il test fenotipico *Trofile*, il quale sfrutta la metodologia degli pseudovirus. La soglia di sensibilità minima della prima versione di questo test (*Original Trofile Assay*, OTA) nella rilevazione delle varianti minori X4 era circa il 10%. In seguito, l'OTA fu sostituito dall'*Enhanced Sensitivity Trofile Assay* (ESTA), una versione la cui sensibilità arriva a 0.3% di rilevazione dei ceppi X4 minoritari. La sensibilità nella rilevazione delle varianti minori è un parametro fondamentale che distingue il saggio fenotipico dai test genotipici, la cui soglia di identificazione delle specie minoritarie non scende al di sotto del 15-20%. L'importanza di rilevare tali varianti è legato alle osservazioni riportate in alcuni studi in cui è stato dimostrato che la replicazione attiva delle specie virali presenti a bassi livelli prima del trattamento può condurre al fallimento virologico. Tuttavia, la soglia al di sopra della quale le varianti X4 minori possono portare al fallimento virologico, in regime di terapia antiretrovirale basata su antagonisti del CCR5, deve ancora essere stabilita. Due diversi studi hanno dimostrato, attraverso *ultra-deep pyrosequencing*, che le varianti X4 presenti oltre il 2% della popolazione totale influenzano negativamente la risposta al trattamento con *Maraviroc*. Tuttavia, non tanto la percentuale di X4 quanto il numero assoluto di virioni X4-tropici potrebbe essere rilevante per predire il fallimento virologico.

Uno dei principali vantaggi del test fenotipico consiste anche nell'essere in grado di determinare il tropismo dei sottotipi non-B. La maggior parte degli algoritmi genotipici, infatti, sono stati sviluppati per il sottotipo B, il ceppo più diffuso in Nord-America ed Europa. Tuttavia il sottotipo C è il più diffuso a livello mondiale e le forme ricombinanti del virus stanno emergendo anche nei Paesi industrializzati. I ceppi non-B rappresentano circa il 20% delle forme di HIV-1 circolanti in Europa e tale aspetto deve essere considerato nella gestione degli antagonisti del CCR5. Studi contrastanti riportano una diversa affidabilità dei test genotipici nella predizione del tropismo nei sottotipi non-B, rendendo necessarie ulteriori correlazioni fra questi test e il fenotipo *in vitro*.

Sebbene i test genotipi siano ormai entrati a far parte delle *routine* diagnostica grazie ai costi ridotti, ai brevi tempi di esecuzione e alle limitate difficoltà tecniche, il fenotipo sugli pseudovirus ricombinanti rimane una pietra miliare nella ricerca e nella prospettiva di trials clinici per gli antagonisti del CCR5. Il fenotipo consente, inoltre, di avere informazioni sul tropismo derivanti dall'intera sequenza di Env, diversamente dal test genotipico che si basa esclusivamente sulla sequenza di V3.

Le regioni esterne al V3 non solo influenzano la predizione del tropismo, ma potrebbero essere di fondamentale importanza nell'individuare i *patterns* di resistenza agli antagonisti del CCR5. Alcune mutazioni esterne al V3 loop, infatti, sembrano essere coinvolte nella resistenza al *Maraviroc*, rendendo il test fenotipico l'unico metodo attualmente in grado di identificare tali *patterns*.

La **determinazione genotipica** del tropismo virale è invece basata sull'amplificazione, il sequenziamento e l'analisi della regione V3 del gene *env* derivato dal paziente. Il sito di legame del corecettore comprende infatti l'ansa V3 di gp120 come fattore più importante della specificità del corecettore e potenzialmente altre regioni di gp120, come V1-V2, C4 e il *bridging sheet* e perfino gp41. [198]

L'estremità dell'ansa di V3, bersaglio della neutralizzazione anticorpale e detentrica di un ruolo chiave nel tropismo e nell'infettività del virus, sembra essere sotto pressione selettiva per l'intera sua lunghezza, che conta quasi sempre 35 residui aminoacidici. La sequenza contiene un motivo altamente conservato, Gly-Pro-Gly-Arg/Gln (GPGR/Q, che occupa i residui 312-315 nella numerazione di HXB2; normalmente si ritrova GPGQ in tutti i sottotipi di HIV-1, tranne nel sottotipo B in cui è più frequente GPGR). [199]

Nessuna delle correnti tecniche prende in considerazione altre regioni di *env* all'infuori di V3; uno studio ha riportato un aumento significativo nell'accuratezza della predizione del tropismo quando entrambe le regioni V2 e V3 vengono utilizzate, rispetto a V2 o V3 singolarmente; la rilevanza clinica dell'inclusione di ulteriori regioni del genoma di HIV-1 per la predizione del tropismo è sconosciuta. [200]

Due diversi approcci di sequenziamento sono stati usati per entrambi DNA ed RNA:

- Il **sequenziamento di popolazione** - o **Population Sequence Analysis** -, è in grado di predire il tropismo per il corecettore delle quasispecie virali più rappresentate nel paziente (al di sopra del 20%). Sebbene questo implichi che non abbia la capacità di rilevare varianti minoritarie non-R5, è stato dimostrato che nella pratica clinica di routine il test genotipico effettuato tramite sequenziamento di popolazione è un affidabile indicatore per individuare i pazienti candidati a ricevere una terapia con antagonisti del CCR5 [201,202], sia su RNA che su DNA provirale, pur tenendo presente che la rilevazione delle specie minoritarie è influenzata dall'HIV-RNA plasmatico (a valori ridotti corrisponde una maggiore prevalenza

di specie minoritarie, viceversa per valori elevati) [203] e che il compartimento dei PBMC è un predittore subottimale rispetto al plasma. [204]

- Il **sequenziamento ad alta processività** – o **Next generation sequencing** – si riferisce ad un'applicazione di nuova generazione che permette simultaneamente di sequenziare e quantificare migliaia di varianti individuali all'interno della popolazione virale, permettendo una quantificazione approfondita (fino allo 0,05% delle varianti minoritarie non-R5 all'interno di un dato campione e, di conseguenza, la proporzione che verosimilmente non risponderà a terapia con gli antagonisti di CCR5). Anch'esso può essere utilizzato su RNA o DNA provirale.

L'utilizzo del corecettore delle sequenze V3 ottenute con l'uno o l'altro dei metodi descritti viene predetto essenzialmente con uno dei due algoritmi bioinformatici che analizzano la sequenza completa di V3: *position-specific scoring matrix* – PSSMX4/R5 – e *geno2pheno[coreceptor]*.

Rispetto ai test fenotipici, i metodi basati sul genotipo sono più semplici dal punto di vista tecnico, più rapidi, più economici e standardizzabili. La predizione genotipica del tropismo tiene conto delle informazioni contenute nella regione di env maggiormente rilevante nell'uso del corecettore, il V3. Nel caso del clonaggio, sequenze senza ambiguità vengono sottoposte all'analisi, mentre il *bulk sequencing* può introdurre dei nucleotidi “misti”, ovvero posizioni in cui due o più basi differenti possono essere rilevate. Le prime mutazioni nella porzione V3 associate al tropismo furono identificate in amminoacidi basici (carichi positivamente) nelle posizioni 11 e/o 25. A questa semplice regola, si aggiunse l'osservazione che la carica netta del peptide risultava essere più elevata nel caso di virus X4 e che anche il numero dei siti di glicosilazione in gp120 poteva correlare con il tropismo (Fig.8). Sebbene un buon numero di ceppi virali venga correttamente classificato con queste approcci, l'introduzione di strumenti bioinformatici ha reso l'interpretazione della sequenza più immediata.

I metodi bioinformatici più utilizzati per l'interpretazione della sequenza della regione V3 sono il *position-specific scoring matrix* (PSSM) e il *Geno2Pheno (G2P) coreceptor*.

Entrambi sono definiti *machine learning methods*, ovvero algoritmi che, a partire da un insieme di dati (*database*), ne estrapolano delle caratteristiche comuni, ossia dei predittori che vengono poi ricercati nella sequenza sottoposta ad analisi. Un principio comune di questi metodi si basa sul “*training*” del modello su cui si basa il software, eseguito attraverso il confronto dei risultati ottenuti con test genotipico e fenotipico su uno stesso campione. Le banche dati utilizzate per il *training* possono essere il *Los Alamos HIV Sequence Database* [205]. Mentre il *Los Alamos Database* fornisce dei dati di elevato standard qualitativo sul genotipo e fenotipo ottenuti con metodi di clonaggio, l’analisi con PSSM sfrutta la sequenza primaria del *V3 loop* e calcola, per ogni singolo amminoacido, la probabilità che essa derivi da un virus X4. La predizione basata su algoritmi, quali G2P, invece, è più accurata e la flessibilità di questi sistemi consente di inserire delle informazioni aggiuntive che possono migliorare il modello, quali informazioni strutturali utili alla simulazione funzionale del *V3 loop*. La predizione di PSSM e di G2P è associata a un punteggio, ovvero a un’informazione quantitativa. PSSM fornisce la somma dei punteggi per tutte le posizioni in cui le sequenze con lo *score* più alto hanno maggior somiglianza. In G2P il risultato R5 o X4 è associato ad un *false positive rate value* (FPR, probabilità di falso positivo), che indica la probabilità che un virus R5 sia classificato erroneamente come variante X4. La scelta di un diverso *cut-off* di FPR ha un impatto decisivo sul risultato. *Cut-off* meno stringenti (ovvero più elevati) riducono infatti la probabilità di classificare erroneamente un virus R5 come X4 ma aumentano anche la probabilità di ottenere falsi X4 positivi. Sebbene non sia stato mai eseguito un trial clinico che valuti il corretto *cut-off* di FPR, sarebbe auspicabile un’analisi a posteriori dei dati delle diverse coorti studiate per stabilire il valore soglia ottimale.

Gli algoritmi basati su *machine learning methods* sono certamente caratterizzati da una maggiore sensibilità di predizione (40/60%) rispetto alle tradizionali regole di interpretazione di *V3*, ma forniscono una predizione binaria, non discriminando le varianti DM-tropiche. Inoltre, il *bulk sequencing* ha la capacità di rilevare le varianti minori in un campione se presenti almeno per il 15-20% all’interno della popolazione. Per aumentare la sensibilità nella rilevazione di queste specie nei campioni di DNA e di plasma con carica virale <1000 copie/mL, alcuni gruppi hanno condotto studi sul tropismo eseguendo il test genotipico in triplicato, ma con risultati non del tutto concordanti.

In alcuni casi, l'analisi in triplicato con un FPR al 10%, aumenta l'incidenza di predizione X4 del 4%, mentre in altri si osserva la stessa proporzione rispetto al test in singolo [206-207]

1.10.8 Tropismo e carica netta del V3 loop

L'evidenza che la carica netta del peptide V3 fosse associata al tropismo è riportata in alcuni lavori [208], sebbene la spiegazione biologica di questa relazione non sia ancora completamente nota. Recentemente, Yokoyama et al. [209] hanno osservato, attraverso sofisticate tecniche di simulazione dinamica molecolare, che nei virus in cui la carica netta del V3 è più bassa (NC= +3), la porzione di gp120 bersaglio di anticorpi neutralizzanti è meno esposta rispetto ai virus in cui NC=+7. Di conseguenza, i virus con bassa NC subirebbero una minor pressione selettiva da parte del sistema immunitario e un minor tasso di variabilità in Env.

1.11 FATTORI DI PROGRESSIONE DELLA MALATTIA: RUOLO DEL TROPISMO DI HIV-1

1.11.1 Fattori implicati nella progressione della malattia

I più importanti determinanti di laboratorio della rapidità di progressione della malattia sono costituiti dalla conta di cellule CD4+ e dai livelli di HIV-RNA plasmatico, considerato non tanto al suo zenith durante le prime fasi dell'infezione acuta quanto al set-point; essi sono stati dimostrati indici indipendenti di predizione della progressione della malattia ad AIDS conclamata e morte [210,211].

E' stato inoltre dibattuto il peso relativo della conta assoluta e della percentuale dei linfociti CD4+ come indici di progressione della malattia: vi sono evidenze che la conta assoluta dei CD4+ possa essere un marker più affidabile quando il numero di CD4+ scende sotto le 350 cell/ μ L, mentre al di sopra di tale cut off sia maggiormente accurata una valutazione della percentuale dei linfociti come marker di progressione della malattia.[212,213,214] Un'altra potenziale variabile nella progressione è costituita dall'attivazione del sistema immune, che può essere indirettamente misurata attraverso metodi di citometria di flusso, ad esempio tramite la rilevazione di CD38 e HLA-DR1 sulla superficie cellulare [215]

Sono stati proposti diversi meccanismi di distruzione delle cellule CD4+ mediata dall'attivazione immunitaria, tra cui la morte cellulare programmata, la morte da "innocent bystander" e la senescenza cellulare accelerata.

Altri fattori implicati sono una sierconversione sintomatica (la presenza di sintomi in corso di infezione acuta è stata correlata con una maggiore rapidità di progressione [216,217], la fitness e la capacità di replicazione virale, determinata attraverso la misurazione della capacità di replicazione di pol per predire il declino immunologico e la progressione di malattia [218], oppure l'infezione con un ceppo virale attenuato che permette il mantenersi di una carica virale soppressa e di un numero elevato di CD4+ [219].

Il sottotipo virale coinvolto all'interno del gruppo M (il più diffuso e studiato) può inoltre avere un ruolo, con evidenze a favore della maggiore virulenza del sottotipo C e D in particolare o di infezione con sottotipi multipli. [220,221,222,223]

1.11.2 Ruolo del tropismo nella progressione

Il ruolo del tropismo per il corecettore nella progressione della malattia è tuttora dibattuto. [224] In generale, i virus R5 sono associati alla trasmissione di HIV e predominano nei primi stadi dell'infezione e nei soggetti naive per la terapia, mentre nel tempo emergono popolazioni X4, in grado di legare anche CXCR4 e rilevabili negli stadi più avanzati in più della metà (fin nel 70%) degli individui infettati. [225]

L'importanza del CCR5 nel dare inizio all'infezione e nello stabilire la persistenza di HIV è stata suffragata da diverse osservazioni, come l'ampia protezione conferita dall'omozigosi per l'allele CCR5 Δ 32, il trapianto di midollo osseo da donatore portatore di mutazione CCR5 Δ 32, la produzione autocrina di ligandi di CCR5 che protegge le cellule CD4+ dall'infezione ed il fatto che la relativa scarsità di cellule T CD4+ CCR5+ negli ospiti naturali di SIV sia associata ad infezione non patogenetica.

Tuttavia, i virus X4 possono occasionalmente essere presenti in individui con una conta elevata di CD4+ o nell'infezione recente. [226,227]

L'evoluzione dall'utilizzo di CCR5 a quello di CXCR4 passa spesso attraverso varianti intermedie in grado di utilizzare entrambi i corecettori.

I virus R5X4 o Dual Mixed (DM), possono essere ulteriormente classificati secondo l'affinità al corecettore come Dual-R (più efficiente utilizzo di CCR5) e Dual-X (più efficiente utilizzo di CXCR4). Le varianti pure R5 rimangono presenti anche posteriormente all'apparizione delle varianti X4, che pure nei primi stadi mostrano evidenza, in vivo, di mutazioni compensatorie aggiuntive. Insieme ad una diminuita replicazione e ad una ridotta affinità per il corecettore delle varianti intermedie, questa scoperta suggerisce che la transizione da R5 a X4 comporti una fase di marcata diminuzione della fitness virale, una sorta di "fitness valley" che separa i genomi dei virus R5 da quelli dei virus X4. [228]

Nei diversi compartimenti anatomici è stata riportata una discordanza tra le popolazioni virali, in special modo nel plasma e nel liquido cerebrospinale, dove si ritrova in generale un virus di tipo R5, andato incontro ad alterazioni adattative che lo rendono abile ad utilizzare bassi livelli di CD4 e CCR5. Le conseguenze cliniche della presenza delle popolazioni virali con diverso tropismo in diversi compartimenti anatomici e cellulari in paragone alle popolazioni virali nel plasma rimangono tuttora poco comprese. [229]

L'utilizzo del corecettore CXCR4 è stato associato alla capacità del virus di essere citopatico in colture cellulari, inducendo la formazione di sincizi in vitro in cellule MT-2 (derivate da co-coltura di linfociti di un soggetto affetto da Leucemia a Cellule T dell'uomo con linfociti derivanti da cordone ombelicale; queste cellule sono portatrici di HTLV-1 e supportano la crescita di HIV). [230,231]

Questa capacità è correlata ad un'accelerata deplezione dei linfociti CD4+ e ad una più rapida progressione alla condizione di AIDS; nello studio di [232] è emerso che la determinazione fenotipica della presenza di ceppi CXCR4 tropici rilevabili correla con minori conte assolute di linfociti CD4+ e livelli più alti di HIV-RNA al baseline in soggetti naive.

Sulla base di queste osservazioni stato postulato che avere un più basso livello di CD4+ sia un forte fattore predittivo della presenza di virus sincizio-induttori che utilizzano il CXCR4. Inoltre, i pazienti più *antiretroviral-experienced* tendono ad avere virus X4 rilevabili con una frequenza più elevata, anche se in associazione a una conta maggiore di cellule T CD4+.

Queste osservazioni sono da tenere in considerazione in previsione di terapia con antagonisti del CCR5, definendo quando possa essere vantaggioso introdurli nel corso della terapia ed i gruppi di pazienti verosimilmente in grado di risponderli. [233]

E' stata documentata la tendenza dei virus X4 ad emergere appena prima dell'inizio del declino nella conta del totale delle cellule T (CD3+), detto "CD3+ *inflection point*", che presagisce l'inizio di una malattia AIDS definente. La capacità di HIV-1 di legare il CXCR4 potrebbe facilitare la distruzione delle cellule T naive, che esprimono preferenzialmente questo recettore rispetto al CCR5, contribuendo ad una più rapida deplezione di cellule T.

2. Disegno dello studio

2.1 CASISTICA

Questo lavoro di tesi ha riguardato 36 pazienti arruolati presso la Divisione Clinicizzata di Malattie Infettive e Tropicali, dell'Ospedale L. Sacco. L'arruolamento è iniziato nel marzo 2012 ed è tuttora in corso, considerando coloro che abbiano raggiunto o meno il primo follow up a 6 mesi e a 12 mesi dalla nuova diagnosi di HIV-Ab sieropositività. Tutti i pazienti hanno fornito un consenso informato alla partecipazione allo studio.

I pazienti sono stati quindi suddivisi in due coorti sulla base dei criteri descritti di seguito:

- **Braccio A: Infezione acuta o recente** (n° = 20 pazienti)

Per **infezione acuta** da HIV si intende la fase nella storia naturale della malattia che ha luogo immediatamente dopo l'infezione.

Il quadro dell'infezione acuta è caratterizzato dalla positività dei test virologici per HIV, con antigene p24 rilevabile e/o HIV-RNA rilevabile, sovente > 10000 copie/mL con negatività dei test sierologici o con un quadro di Western Blot indeterminato (presenza di 1-2 bande positive; gli anticorpi contro p24, gp41 e gp120 sono i primi a positivizzarsi), la cui evoluzione va seguita nel tempo per confermare l'avvenuta sieroconversione.

Una sintomatologia clinica aspecifica è associata alla sieroconversione nel 40-90% dei casi, tuttavia è così modesta da condurre raramente il paziente all'attenzione medica.

Sono considerate infezioni acute le nuove diagnosi in pazienti con un quadro laboratoristico corrispondente a quello descritto, che eseguano il test per sintomatologia acuta e/o a seguito di un episodio di esposizione al rischio di infezione.

Viene definita invece **infezione recente** l'infezione da HIV avvenuta entro sei mesi, diagnosticata in seguito a riscontro di positività sierologica in un paziente asintomatico, con un test negativo documentato eseguito non più di 6-12 mesi prima del primo test risultato positivo, o nel quale sia stata osservata una sieroconversione (ad esempio con il riscontro di una evoluzione del profilo del Western Blot nei sei mesi precedenti in assenza di sintomatologia clinica).

I pazienti inclusi in questa coorte erano per l'85% di genere maschile, nella totalità dei casi di nazionalità italiana e con un'età mediana di 39 anni (min-Max). Per tutti i soggetti in

studio la modalità di infezione era rappresentata da rapporti sessuali non protetti (21% eterosessuali, 63% omosessuali, 10% bisessuali).

- **Braccio B: AIDS presenters** (n° = 16 pazienti)

I pazienti sono stati inclusi in questa coorte in accordo con la classificazione redatta dal *Center for Disease Control (CDC)* del 1993 come revisione della precedente classificazione del 1987.

E' considerato in stadio di AIDS un paziente che presenti una delle condizioni opportunistiche definenti la malattia o che abbia un numero di linfociti T CD4+ inferiore a 200/ μ L.

STADIAZIONE	Stadio 1 T CD4 > 500/ μ l	Stadio 2 T CD4 200- 500/ μ l	Stadio 3* T CD4 <200/ μ l
Stadio A Condizioni asintomatiche	A1	B1	C1
Stadio B Condizioni non indicative di AIDS	A2	B2	C2
Stadio C* Condizioni indicative di AIDS	A3	B3	C3

*Lo stadio 3 è considerato di per sè indicativo di AIDS.

*STADIO C – INFEZIONI OPPORTUNISTICHE AIDS-DEFINENTI
Candidosi esofagea, della trachea, dei bronchi o polmonare (candidosi profonda)
Carcinoma invasivo della cervice uterina
Coccidioidomicosi extrapolmonare
Criptococcosi extrapolmonare
Criptosporidiosi, cronica intestinale (> 1 mese)
Encefalopatia da HIV (AIDS-dementia complex)
Infezione da HSV mucocutanea cronica > 1 mese; esofagite, bronchite, polmonite
Isosporiasi (> 1 mese)
Istoplasmosi extrapolmonare
Leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML)
Linfoma cerebrale primitivo
Linfoma non Hodgkin ad elevato grado di malignità (immunoblastico, Burkitt-like)
Malattia da CMV (corioretinite, esofagite, encefalite, colite, poliradiculonevrite)
Malattia disseminata da M. avium, M. kansasii o altri micobatteri atipici
Polmonite batterica ricorrente (almeno due episodi documentati in 12 mesi)
Polmonite da Pneumocystis carinii
Toxoplasmosi cerebrale o disseminata
Tubercolosi polmonare ed extrapolmonare
Sarcoma di Kaposi
Sepsi ricorrente da Salmonella spp (non typhi)
Wasting syndrome HIV-correlata

I soggetti di questa coorte erano di genere maschile nella totalità dei casi, di nazionalità italiana nell'80% e latinoamericana nel 20% (Perù e Brasile) e con un'età mediana di 42 anni (min-max).

La modalità di infezione era correlata a rapporti sessuali a rischio (50% eterosessuale, 25% omosessuale, 18% bisessuale e 6% transessuale).

2.2 PROTOCOLLO: ANALISI E FOLLOW-UP

Il protocollo dello studio prevede di seguire ciascun paziente per un periodo di tre anni, con prelievi ematici ad intervalli di 6 mesi per seguire l'evoluzione del tropismo virale parallelamente alle modificazioni immuno-virologiche dell'ospite.

Le analisi effettuate in congiunzione con la determinazione del tropismo virale al tempo zero e a ciascun follow up sono riportate di seguito:

TIPOLOGIA ANALISI	Baseline	Follow-up successivi
Tropismo virale	•	•
HIV-RNA plasmatico	•	•
Linfociti T CD4+ (valore assoluto)	•	•
Linfociti T CD4+ (%)	•	•
Linfociti T CD8+ (valore assoluto)	•	
Rapporto T CD4/T CD8	•	
Zenith HIV-RNA plasmatico	•	
Nadir T CD4+ (valore assoluto)	•	

2.3 TERAPIA

Tutti i pazienti al momento del reclutamento (baseline) erano naive per la terapia antiretrovirale e ciascuno di essi dopo diagnosi di HIV-Ab sieropositività ha iniziato una terapia antiretrovirale, sia che appartenga al braccio degli AIDS presenters, dove l'inizio del trattamento è raccomandato nelle linee guida italiane ed internazionali, sia nel braccio delle infezioni acute/recenti, dove si è deciso l'inizio del trattamento in base alle evidenze provenienti da recenti studi randomizzati, benchè non sia ancora univocamente raccomandato nelle linee guida a livello nazionale ed internazionale.

I pazienti hanno ricevuto ciascuno la terapia più idonea in considerazione di profilo immunologico, livelli di HIV-RNA plasmatico, condizioni patologiche di base e interazioni con eventuali terapie concomitanti.

4 dei pazienti con tropismo R5 nella coorte di infezioni acute/recenti hanno assunto maraviroc.

2.4 OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'obiettivo del nostro studio è quello di seguire nel tempo l'evoluzione della regione ipervariabile V3 di gp120 situata all'interno del gene *env*, determinante il tropismo del virus, e di valutarne l'influenza sull'andamento immunovirologico nelle due coorti di pazienti, con infezione acuta/recente ed AIDS presenters.

Lo studio di queste dinamiche permetterà anche di effettuare, nelle popolazioni a diverso tropismo R5 o X4, una valutazione a lungo termine dell'efficacia del trattamento con le diverse classi di inibitori e con l'antagonista di CCR5 maraviroc in modo particolare; questo in vista di un'ottimizzazione delle strategie terapeutiche, in particolare nel contesto dell'infezione acuta dove l'indicazione al trattamento non è ancora codificata, né è codificata una linea terapeutica di efficacia superiore rispetto alle altre.

2.5 LIMITI DELLO STUDIO

Il principale limite incontrato nel corso dello studio ha riguardato la difficoltà nel determinare la numerosità del campione rapportata alla misurazione dei parametri immunovirologici.

Un secondo limite ha riguardato l'eterogeneità dei trattamenti: ciò è comprensibile in quanto il trattamento dell'infezione acuta non è codificato dalle linee guida a livello nazionale e internazionale. Inoltre, l'importanza dell'approccio terapeutico sperimentale verte particolarmente sul 4° farmaco (i.e. maraviroc o raltegravir), la cui scelta si basa su caratteristiche variabili.

3. Materiali e Metodi

3.1 MODALITA' DI RACCOLTA, PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI.

3.1.1 Raccolta di sangue intero

Il sangue prelevato dai pazienti è stato trasferito in una provetta contenente anticoagulante (EDTA o acido etilendiaminotetracetico); da qui sono stati prelevati 3 mL di sangue intero e divisi in tre aliquote da 1 mL in provette con tappo a vite, poste immediatamente a – 80°C.

3.1.2 Separazione di plasma da sangue

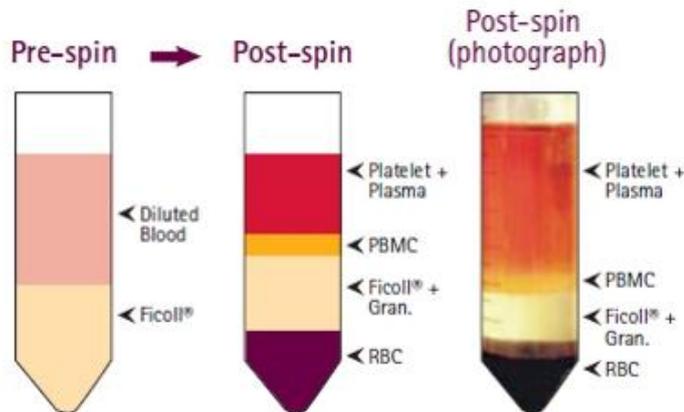
Per la separazione del plasma è stato necessario centrifugare la parte rimanente di sangue intero a 1900 rpm (rotazioni per minuto) per 10 minuti. Il surnatante contenente plasma è stato poi trasferito in una provetta Falcon da 15 mL ed è stato nuovamente centrifugato, questa volta a 3800 rpm per 10 minuti. E' stato ottenuto surnatante contenente plasma, che è stato prelevato e suddiviso in 4 aliquote da 1-1,25mL in provette con tappo a vite, poste immediatamente a – 80°C.

3.1.3 Separazione di cellule mononucleate da sangue periferico

Le cellule mononucleate del sangue periferico (o PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells), sono state ottenute grazie a separazione per gradiente di densità.

Nello specifico, 20 mL di sangue intero trattati con EDTA sono stati stratificati su 20 mL di Ficoll-Paque (Biochrom) e successivamente centrifugati a 1970 rpm per 30 min a temperatura ambiente.

Il Ficoll-Paque è un copolimero sintetico ramificato di alto peso molecolare, molto idrosolubile, sintetizzato a partire da saccarosio e epicloridrina. Il raggio di singole molecole di Ficoll raggiunge i 2-7 nm; le soluzioni ottenute sciogliendo il polimero in acqua sono utilizzate per preparare gradienti di densità per la separazione cellulare.



Al termine della centrifugazione, è stata recuperata la fase intermedia risultante, contenente le cellule mononucleate, che sono state sottoposte a due cicli di lavaggio mediante PBS o Phosphate Buffered Saline (*Euroclone*) e nuovamente centrifugate a 1400 rpm per 10 minuti. Dopo colorazione vitale con Trypan Blue, colorante in grado di evidenziare selettivamente le cellule morte, è stata calcolata la concentrazione delle cellule mononucleate mediante conta al microscopio ottico. I PBMC sono stati quindi risospesi in 1 mL di terreno di congelamento (*per ogni più o meno 10^7 PBMCs*) costituito per 10% DMSO o Dimetilsolfossido (*Sigma-Aldrich*), che agisce da crioprotettore, e per il 90% da FBS o Fetal Bovine Serum (*HyClone Europe*), che garantisce l'apporto di fattori di crescita, ormoni, chelanti e sostanze detossificanti utile alla sopravvivenza cellulare. Il terreno va preparato e mantenuto a freddo. I PBMC sospesi nel terreno di congelamento sono stati trasferiti in provette Cryovial normalmente in un numero dell'ordine di 10^7 , considerando che al momento dello scongelamento si otterrà una resa del 50% circa; le provette Cryovial sono state infine poste a -80°C all'interno di un Cryobox da congelamento, in modo da far scendere la temperatura gradualmente di 1°C al minuto. Verranno successivamente trasferite e conservate in azoto liquido.

3.2. METODICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

3.2.1 Estrazione di RNA virale da plasma

La procedura di estrazione dell'RNA è stata eseguita per i campioni provenienti da pazienti, perlopiù non in terapia, che hanno carica virale plasmatica rilevabile; in caso di carica virale soppressa o di un numero esiguo di copie virali plasmatiche si procede invece all'estrazione di DNA provirale integrato, descritta più avanti.

L'RNA virale è stato estratto mediante kit QIAamp (*Qiagen*).

Un'aliquota da 1 – 1,5 mL di plasma è stata posta in tubi Eppendorf, mantenuti in ghiaccio, e centrifugata a 25.000 g per 1 ora a 4°C.

Dopo centrifugazione è stato eliminato il surnatante e il pellet ottenuto è stato incubato per 10 minuti a temperatura ambiente con 560 µL di AVL Buffer in modo da lasciar avvenire la lisi cellulare.

E' stata arrestata l'azione del Buffer AVL aggiungendo 560 µL di etanolo al 95%. Il campione è stato trasferito nelle apposite colonne fornite dal kit e centrifugato a 8.000 rpm per 1 minuto, per poi eliminare l'eluato.

E' stato effettuato quindi un primo lavaggio con 500 µL di AW1 Buffer e centrifugato a 8.000 rpm per 1 minuto; si prosegue poi con un secondo lavaggio con 500 µL di AW2 Buffer e si centrifuga nuovamente a 8000 rpm per 1 minuto.

Sono stati aggiunti 50 µL di acqua alle colonnine che, dopo essere poste in incubazione a 80°C per 1 minuto, devono infine essere centrifugate a 8000 rpm per 1 minuto. Eliminato l'eluato, vengono poste in ghiaccio.

3.2.2 Retrotrascrizione a cDNA

Il campione è stato risospeso in una quantità variabile di RNA Diluent, e sono stati prelevati 8 μL per la reazione di retrotrascrizione.

Il quantitativo di diluente da utilizzare è stato calcolato in base alla carica virale del plasma di partenza, in modo da ottenere una concentrazione finale compresa tra 500 e 1.000 copie/ μL ; in questo modo l'aliquota da 8 μL utilizzata per la retrotrascrizione conterrà un quantitativo di acido nucleico ottimale (da 5.000 a 10.000 copie) per lo svolgimento della reazione.

L'eventuale RNA rimanente è stato conservato a -80°C .

Utilizzando i reagenti contenuti nel modulo per la retrotrascrizione, è stata preparata la mix per la RT-PCR (SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR, *Invitrogen*).

Essa conterrà Buffer (2X), l'enzima retrotrascrittasi e l'RNA estratto.

REAGENTE	VOLUME (per campione)
Buffer 2X	10 μL
Enzima RT	2 μL
RNA estratto	8 μL
Totale	20 μL

Il funzionamento del modulo è basato sulla trascrittasi inversa del virus della leucemia murina di Maloney (Maloney Murine Leukemia Virus, MuLV), che estende un primer specifico per l'RNA virale contenuto nel buffer di reazione, sintetizzando una molecola di cDNA a doppio filamento. Il kit contiene dei *random primers* che permettono così di

retrotrascrivere tutto HIV-1 che può essere poi sottoposto ad ulteriore amplificazione per la regione di interesse.

Terminata questa fase, è stata aggiunta l'aliquota di RT mix e sono stati inseriti i campioni in un termociclatore per far avvenire la reazione di PCR.

Temperatura	Tempo	Processo
25°C	10'	Retrotrascrizione
50°C	30'	
85°C	5'	Inattivazione RT
4°C	∞	Conservazione

Al termine della reazione è stato aggiunto 1 µL di RNasi H di E.Coli ed è stato incubato a 37°C per 20 minuti.

Il cDNA così ottenuto viene stoccato a – 20°C.

3.2.3 Estrazione di DNA

In caso di campione proveniente da paziente con carica virale soppressa o molto ridotta, si procede all'estrazione da pellet o sangue intero di DNA provirale integrato, mediante kit QIAamp (*Qiagen*), con la seguente procedura:

1. Il pellet è stato risospeso in 200 µL di PBS (*Euroclone*) ogni 5×10^6 cellule in tubi autoclavati, mentre per quanto riguarda il sangue 300 µL sono stati aggiunti in una provetta autoclavata;

2. Sono stati aggiunti 20 μL di proteinasi K, con il ruolo di far avvenire la lisi delle membrane cellulari, e di seguito 200 μL di Buffer L;
3. i tubi autoclavati sono stati incubati a 56°C per 10 minuti;
4. sono stati aggiunti 200 μL di etanolo 100%;
5. i campioni sono stati vortexati e spinnati;
6. la mix è stata trasferita nelle QIAamp spin columns, che vengono centrifugate a 8000 rpm per 1 minuto;
7. ogni colonna è stata spostata in un nuovo tubo e il filtrato viene scartato, mentre il filtro trattiene il DNA;
8. sono stati aggiunti 500 μL di Buffer AW1 per campione;
9. è stata eseguita una centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto;
10. le colonne sono state trasferite ciascuna in un nuovo tubo ed il filtrato eliminato;
11. sono stati addizionati 500 μL di Buffer AW2;
12. È stata eseguita una prima centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto e, dopo aver sostituito i tubi, una seconda alla velocità massima per 2 minuti;
13. ogni colonna è stata trasferita in una provetta Eppendorf a clip, dove sono stati aggiunti 50 μL di Buffer AE o alternativamente di H_2O distillata;
14. si è proceduto ad incubare i campioni a temperatura ambiente per 5 minuti;
15. sono stati centrifugati infine i campioni a 8000 rpm per 1 minuto.

Il campione di dsDNA risultante è stato analizzato allo spettrofotometro a 260 nm per determinarne la concentrazione.

3.2.4 Amplificazione della regione V3 del gene ENV

In seguito all'estrazione di DNA è stata effettuata l'amplificazione tramite Nested-PCR. Tale tecnica è una variazione della PCR classica e prevede due reazioni di amplificazione successive utilizzando due diverse coppie di primer. Oltre ai campioni estratti sono stati aggiunti un controllo negativo, costituito da 10 µL di H₂O, e un controllo positivo, costituito da 10 µL di cDNA estratto da linea cellulare HIV-infetta.

Nel primo ciclo di amplificazione si utilizza una singola coppia di primer più esterni (concentrazione 10µM) :

- il primer senso PSA (5'-TACAATGTACACATGGAATT-3'), con T_m = 46,7°C
- il primer antisenso PSD (5'-ATTACAGTAGAAAAATTCC-3'), con T_m = 41,9°C

REAGENTE	QUANTITA' (per campione)
H ₂ O distillata	21,8 µL
Buffer 5x	10 µL
dNTPs	4 µL
Mg ²⁺ (<i>Promega</i>)	3 µL
Primer PSA	0,5 µL
Primer PSB	0,5 µL
Taq (<i>Promega</i>)	0,2 µL
Volume totale	40 µL

A questa mix sono stati aggiunti 10 μL di DNA virale estratto ed il tutto è stato sottoposto ad amplificazione in un termociclatore così impostato:

Temperatura	Tempo	Cicli	Processo
94°C	2'	1 ciclo	Attivazione della Taq
94°C	30''	50 cicli	Denaturazione
55°C	30''		Annealing dei primer
72°C	2'		Estensione
72°C	10'	1 ciclo	Estensione finale
4°C	∞		Conservazione

Il secondo ciclo di amplificazione prevede poi l'uso di una coppia di primer interni al frammento già amplificato (concentrazione 10 μM):

- il primer senso PSB (5'-TGGCAGTCTAGCAGAAGAAG-3'), con $T_m = 54,2^\circ\text{C}$
- il primer antisenso PSC (5'-TCTGGGTCCCCTCCTGAGGA-3'), con $T_m = 61,9^\circ\text{C}$

REAGENTE	QUANTITA' (per campione)
H ₂ O distillata	21,8 μL
Buffer 5x	10 μL
dNTPs	4 μL
Mg ²⁺ (<i>Promega</i>)	3 μL
Primer 1	0,5 μL
Primer 2	0,5 μL
Taq (<i>Promega</i>)	0,2 μL
Volume totale	40 μL

Per il secondo step sono stati utilizzati 10 μL del prodotto del primo step per ciascuna mix, a seconda della quantità di H_2O utilizzata, in modo da arrivare a un volume totale di 50 μL .

Il termociclatore è stato dunque impostato nel seguente modo:

Temperatura	Tempo	Cicli	Processo
94°C	2'	1 ciclo	Attivazione della Taq
94°C	30''	50 cicli	Denaturazione
55°C	30''		Annealing dei primer
72°C	2'		Estensione
72°C	10'	1 ciclo	Estensione finale
4°C	∞		Conservazione

3.2.5 Rilevamento dei prodotti di PCR

Il rilevamento dei prodotti di amplificazione si ottiene mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1,5% in tampone TAE 1X.

La migrazione del DNA su gel di agarosio dipende dalla lunghezza del frammento di DNA analizzato rispetto alla concentrazione dell'agarosio stesso.

Le bande prodotte in seguito alla migrazione del DNA vengono esaminate esponendo il gel alla luce ultravioletta; per questo motivo nel gel stesso viene incorporato un colorante fluorescente, etidio bromuro (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), che si intercala tra le basi dell'acido nucleico.

E' possibile riconoscere l'amplificato di nostro interesse tramite il confronto con un opportuno standard di riferimento o marker a concentrazione nota, che viene caricato in ogni corsa elettroforetica contemporaneamente ai campioni in esame.

Il confronto con il marker di riferimento consente anche l'eventuale quantificazione dell'amplificato in esame.

3.2.6 Purificazione dei prodotti di PCR

La purificazione dei prodotti di PCR è eseguita impiegando il kit di purificazione QIAquick (Qiagen). Essa permette di rimuovere efficacemente tamponi di reazione, enzimi, primer e dNTPs (marcati o non). Un limite di questo kit è rappresentato dalle dimensioni del frammento, che devono essere comprese tra 100 bp e 10 Kb. La purificazione avviene tramite la seguente procedura:

- al prodotto del secondo step di PCR è stato aggiunto un volume 5 volte maggiore di BPI (200 µL di Buffer per 40 µL di campione) all'interno di colonnine di purificazione;
 - sono stati centrifugati i campioni a 14000 rpm per 1 minuto;
 - è stato eliminato l'eluato e trasferito le colonnine in provette Eppendorf senza tappo;
 - sono stati centrifugati i campioni a 14000 rpm per 1,5 minuti;
 - è stato eliminato l'eluato e le colonnine sono state trasferite in provette Eppendorf a clip;
- per raccogliere infine dal filtro l'eluato contenente il solo DNA purificato si porta dell' H₂O ultrapurificata alla temperatura di 60°C mediante termoblocco e se ne aliquotano 50 µL all'interno della colonnina;
- è stato centrifugato a 14000 rpm per 1 minuto;
 - le colonnine sono state eliminate e il DNA purificato, contenuto nelle Eppendorf a clip, è stato conservato a 4°C.

3.3. SEQUENZIAMENTO

3.3.1 Reazione di sequenza

Il sequenziamento dei prodotti di PCR è stato condotto secondo metodo Sanger con il sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 xl (Applied Biosystems Inc, Foster City, California, USA), utilizzando la tecnica del cycle sequencing (*Big Dye Terminator v3.1*); in questa variante della PCR, il DNA viene amplificato con una DNA polimerasi termostabile a partire da un unico primer di sequenza, in presenza di dideossiribonucleotidi (ddNTPs) marcati ciascuno con un diverso fluorocromo (FAM, JOE, TAMRA e ROX).

I dideossiribonucleotidi sono definiti terminatori in quanto mancano del gruppo idrossile in 3', coinvolto nella formazione del legame fosfodiesterico tra i nucleotidi che costituiscono le molecole di DNA; la loro incorporazione al posto dei normali deossiribonucleotidi (dNTPs) nella catena nascente del DNA, determina l'arresto della reazione di polimerizzazione.

Il rapporto di concentrazione tra ddNTPs e dNTPs è calcolato in modo che la polimerasi termini la catena nascente in ogni posizione in cui il nucleotide può essere inserito, formando così una serie di frammenti sfasati e marcati in 3', che condividono tutti l'estremità del *primer*.

L'utilizzo di un enzima termostabile permette di svolgere l'attività di polimerizzazione del DNA ad alte temperature, minimizzando i problemi causati dalla formazione di strutture secondarie del DNA, di legami aspecifici e da interazioni fra i primer. Inoltre, come nella normale PCR, l'enzima resiste alla denaturazione quando la miscela di sequenziamento è incubata a 96° C, permettendo la realizzazione dei cicli successivi di estensione.

La miscela di reazione utilizzata è la seguente:

REAGENTE	QUANTITA'
H ₂ O distillata	4,7 µL
Enzima Big Dye	1,1 µL
Primer F (PSB)	3,2 µL
Primer R (PSC)	3,2 µL
DNA purificato	1 µL

Il termociclatore viene dunque impostato come di seguito:

Temperatura	Tempo	Cicli	Processo
96°C	1'	1 ciclo	Attivazione Big Dye
96°C	10''	25 cicli	Denaturazione
50°C	5''		Annealing dei primer
60°C	4'		Estensione
4°C	∞		Conservazione

3.3.2 Purificazione dei prodotti di sequenza

La purificazione dei prodotti di sequenza è stata effettuata utilizzando la precipitazione in etanolo con sodio acetato.

I campioni da purificare sono stati miscelati con 50 µl di etanolo al 100% e 2 µL di sodio acetato (2M, pH=4), lasciati in ghiaccio per 10 minuti e in centrifugati a 14.000 rpm per 30 minuti.

Una volta rimosso il surnatante, sono stati aggiunti 250 µl di etanolo al 70% e si è proceduto alla centrifugazione nuovamente a 14.000 rpm per 5 minuti.

A questo punto il residuo di etanolo è stato rimosso in parte tramite pipetta in parte per evaporazione portando a secco i pellet di DNA tramite incubazione a 95°C per 3 minuti circa a provetta Eppendorf aperta.

La conservazione avviene a -20°C.

3.3.3 Caricamento e condizioni di corsa

Ogni campione è stato risospeso in 10 µL di H₂O ultrapura e 2 µL di questi sono stati caricati con 8 µL di formammide, un solvente organico che permette di destabilizzare gli appaiamenti evitando la formazione di dimeri di DNA.

La denaturazione è stata eseguita a 95°C per 2 minuti.

Il sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem Inc, Foster City, CA, USA) è un sistema che permette l'analisi del DNA sfruttando l'elettroforesi capillare. Uno specifico software collegato al sequenziatore provvede all'acquisizione dei dati durante la corsa elettroforetica.

3.3.4 Analisi delle sequenze

Per l'analisi e l'assemblaggio delle sequenze è stato utilizzato il programma *Seqscape v 2.5TM* (Applied Biosystem, Foster City, California, USA), in grado di paragonare e assemblare i frammenti di DNA neosintetizzati con la sequenza di riferimento. Il programma è, inoltre, in grado di mostrare un unico elettroferogramma.

Gli elettroferogrammi di più sequenze vengono mostrati contemporaneamente. E' così possibile verificare l'affidabilità della lettura su entrambe le eliche e, in caso di dubbio

interpretazione, si può ricorrere al confronto tra le sequenze della stessa regione ottenute da PCR indipendenti, per escludere errori di misincorporazione causati dalla Taq polimerasi.

3.3.5 Ultra deepsequencing

Questa nuova tecnica di sequenziamento rispetto al metodo di Sanger ha rivoluzionato il metodo di sequenziamento. Il metodo di Sanger visto in precedenza, risulta avere degli svantaggi soprattutto per quel che riguarda la necessità di utilizzare gel per la corsa elettroforetica dei frammenti, il basso numero di campioni analizzabile in parallelo e la difficoltà di automazione del processo. Ad oggi tre piattaforme di sequenziamento di nuova generazione stanno avendo maggiore impatto sul mondo scientifico: il 454 della Roche, il Solexa dell'Illumina ed il Solid dell'Applied Biosystem.

Grazie a queste tecniche è possibile ottenere sequenze da singoli frammenti di DNA o da frammenti amplificati mediante PCR, eliminando la necessità di effettuare il clonaggio in sistemi batterici, un procedimento che sarebbe più lungo e problematico. Nonostante la minore lunghezza dei frammenti analizzati, la possibilità di effettuare un gran numero di letture in parallelo permette di ottenere in poco tempo una grande mole di dati. In particolare il sistema 454 della Roche utilizzato in questo lavoro di tesi, rappresenta il primo modello di nuova generazione introdotto nel mercato del 2005.

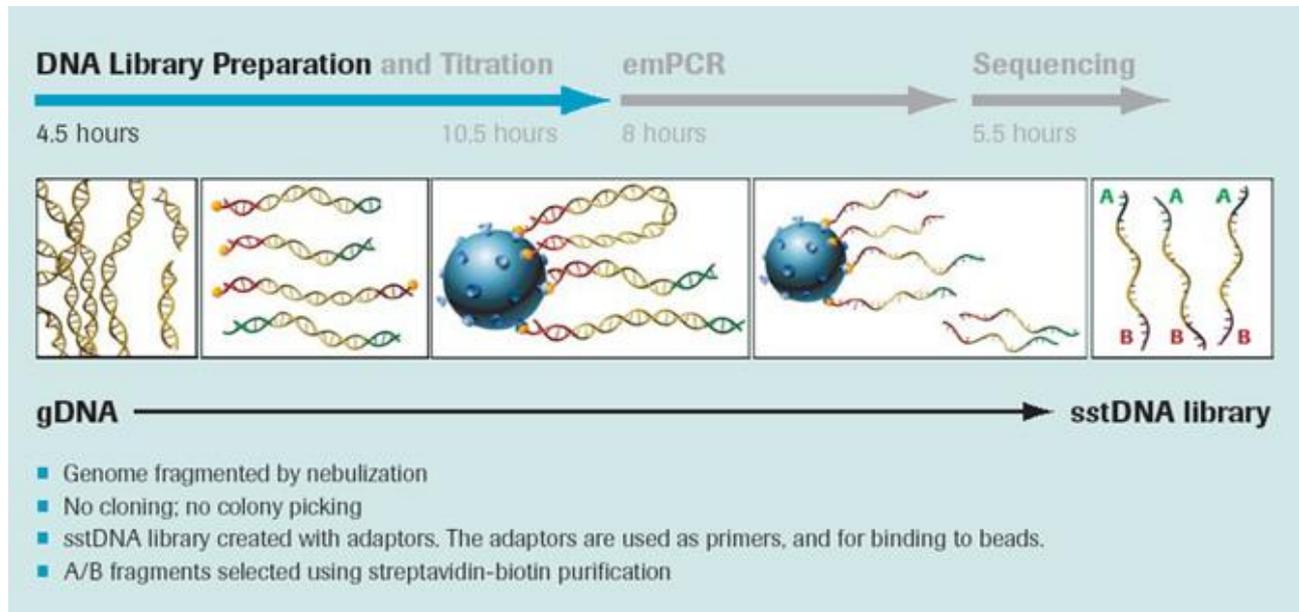
Tale approfondimento dell'analisi genotipica del tropismo virale, è attualmente in corso di realizzazione in collaborazione con un altro centro – *Centre for Excellence in HIV/AIDS, University of British Columbia, Vancouver* – sui medesimi campioni dei pazienti arruolati nel nostro studio. I campioni sono stati considerati non-R5 se la loro percentuale è $\geq 2\%$ della popolazione virale secondo quanto emerso dagli studi MOTIVATE [234]

Il metodo consiste in:

1. Preparazione della libreria di DNA

Il materiale di partenza che si vuole sequenziare può essere costituito da DNA genomico, da prodotti di PCR, o cDNA. Il DNA genomico di grandi dimensioni, viene frammentato mediante nebulizzazione in pezzi da 300/500 paia di basi. Per i frammenti di piccole

dimensioni come i prodotti di PCR e small RNA non è necessaria la frammentazione. Con questa metodica non viene effettuato il clonaggio.



Vengono aggiunti e ligati due diversi piccoli adattatori a doppio filamento alle estremità 5' e 3' del DNA frammentato. L'adattatore B (evidenziato in rosso nella figura) contiene Biotina al 5' che permette il legame del DNA alle palline rivestite di streptavidina.

Dalla reazione di ligazione si possono generare 3 diverse popolazioni di frammenti:

A\B che si legano alla biglia con un solo filamento

B\B si legano con tutti e due i filamenti

A\A non si legano perché mancano di biotina e vengono persi con il lavaggio.

Si effettua la selezione dei frammenti A/B tramite purificazione con la streptavidina.

Dopo la denaturazione vengono rilasciati i filamenti non biotinilati che serviranno da templati per la libreria (sstDNA).

Gli adattatori vengono usati come *annealing* sia per i *primers* di amplificazione che per quello di sequenziamento.

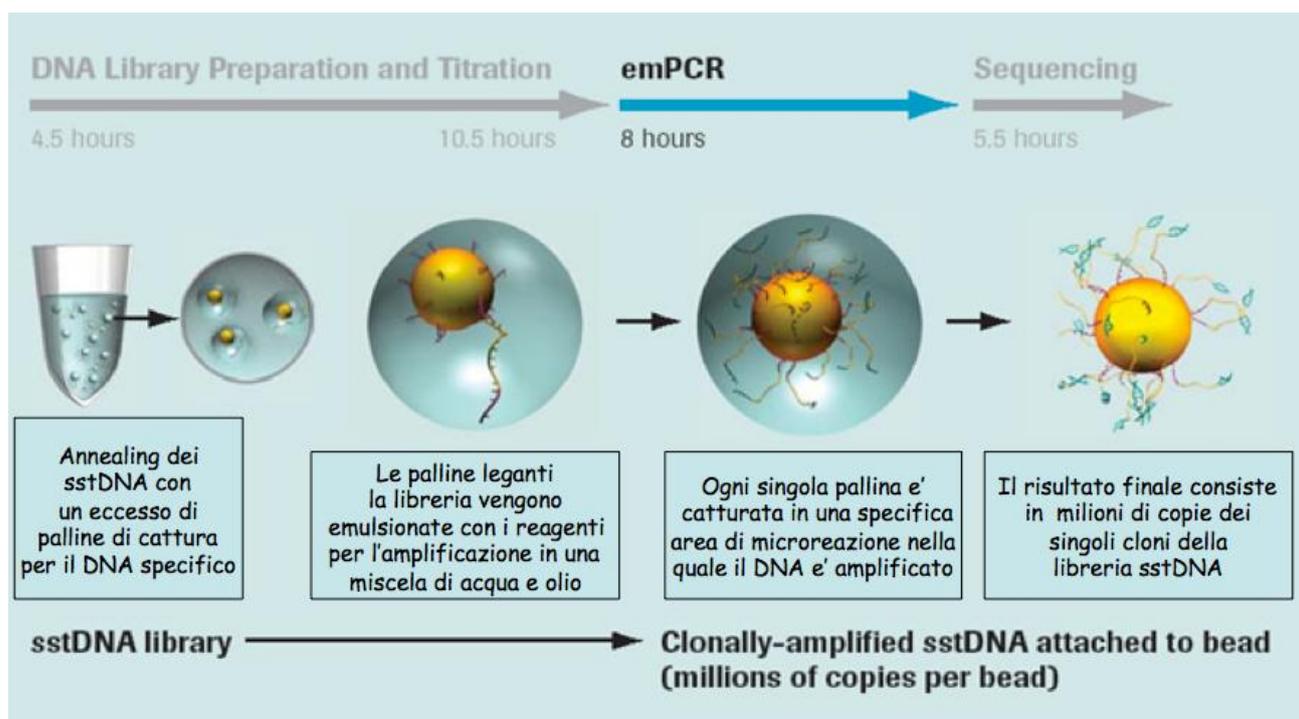
2. PCR in Emulsione

La libreria di *single strand* di DNA funge da template per la PCR in emulsione; questa permette di amplificare all'interno della stessa provetta una grande quantità di frammenti di DNA.

Vengono utilizzate apposite biglie sulla cui superficie sono presenti sequenze oligonucleotidiche complementari all'adattatore B dei single strand. I frammenti della libreria vengono mescolati con un eccesso di biglie in maniera che ogni biglia si legherà ad un solo frammento di sstDNA.

L'emulsione viene creata mescolando la mix di PCR con olio minerale; si creano così delle micelle di pochi μl di mix di PCR in emulsione nell'olio: ogni micella contenente una biglia si comporta da micro reattore. Alla fine sulla superficie della biglia saranno presenti fino a 10 milioni di copie del frammento. L'intera collezione di frammenti viene amplificata contemporaneamente in una stessa provetta.

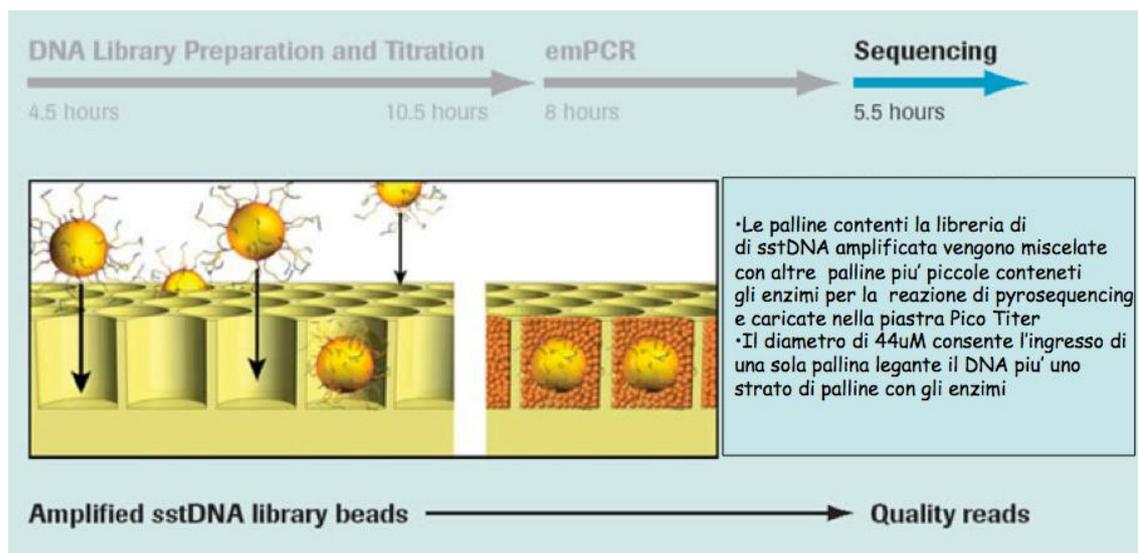
Successivamente saranno purificate tutte le biglie "produttive" ovvero quelle che effettivamente hanno legato il frammento di sstDNA e che sono andate incontro ad amplificazione.



3. Reazione di sequenziamento

Le biglie vengono deposte in una piastra Pico Titer costituita da circa 1,6 milioni di pozzetti, i quali hanno un diametro tale da poter accomodare un'unica biglia.

A questo punto viene aggiunta la DNA polimerasi ed altre sferette a cui sono legati covalentemente gli enzimi responsabili della reazione di pirosequenziamento.



Dopo aver caricato le biglie ed i reagenti nella PTP(Pico Titer Plate), questa viene posizionata nello strumento di fronte ad una fotocamera ad alta risoluzione (CCD Camera).

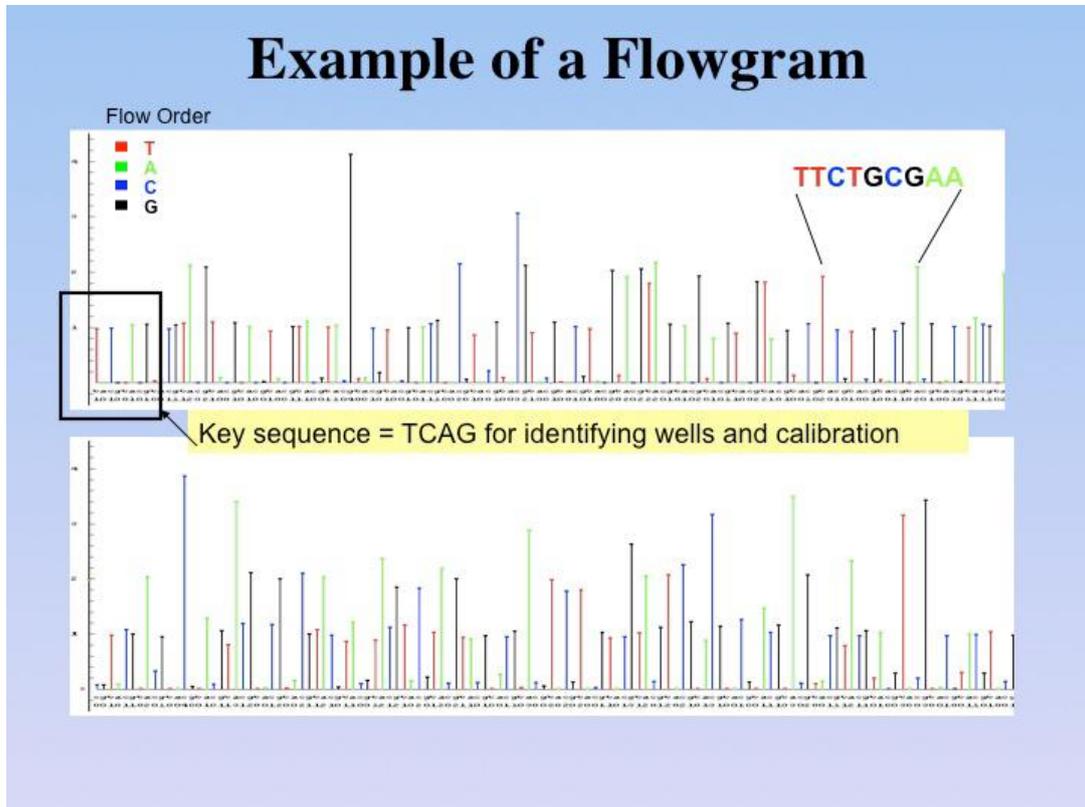
Nello strumento è presente una camera di flusso che fa fluire i deossinucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) perpendicolarmente ai pozzetti della PTP, sequenzialmente in ordine prefissato (TACG).

Ogni qualvolta avviene l'incorporazione di un nucleotide in un pozzetto si ha un'emissione luminosa che passa attraverso il fondo dei pozzetti e viene catturata dalla CCD camera.

Le reazioni che avvengono in ogni pozzetto della PTP vengono rilevate e registrate in continuo ed in contemporanea per tutti i pozzetti.

Ciascun flusso (passaggio di un nucleotide) viene quindi tradotto in immagine. L'analisi delle immagini associata all'ordine dei flussi permette di costruire il fluorogramma di ciascun pozzetto.

Infine, il software elabora tutte le immagini e converte i dati grezzi in un fluorogramma in cui l'intensità della luce emessa è proporzionale al numero di nucleotidi incorporati. [235]



3.4. METODI COMPUTAZIONALI

3.4.1 Predizione del tropismo virale

Il tropismo virale è stato determinato dalle sequenze ottenute tramite geno2pheno[coreceptor], algoritmo bioinformatico che analizza la sequenza completa di V3. Il sistema utilizza come riferimento un set di sequenze nucleotidiche che corrispondono a fenotipi R5, DM o X4; queste sequenze nucleotidiche vengono utilizzate come input per il sistema, quindi vengono considerate le combinazioni amminoacidiche.

L'ansa V3 ed entrambi i co-recettori posseggono una carica determinata dalla presenza di aminoacidi basici (lisina e arginina), aminoacidi acidi (aspartato e glutammato) e modificazioni post-trascrizionali (perlopiù N-glicosilazioni, O-glicosilazioni e solfatazioni a carico della tirosina).

Le interazioni elettrostatiche hanno un ruolo determinante nel legame del co-recettore. [198]

La carica netta di V3 viene calcolata sottraendo i residui carichi negativamente, aspartato (D, carica -1) e glutammato (E, carica -1), da quelli carichi positivamente, arginina (R, carica +1), lisina (K, carica +1) e istidina (H, carica +0,293) nella propria sequenza codificante. Una carica netta positiva ≥ 5 è considerata predittiva di un tropismo X4, mentre una carica positiva < 5 è al contrario considerata predittiva di un tropismo R5. Inoltre, secondo la regola 11/25, la presenza di aminoacidi carichi positivamente (R o K) alle posizioni 11 o 25 di V3 è considerata predittiva di tropismo X4. [236,237]

Il risultato dell'interpretazione viene fornito come valore quantitativo, il False Positive Rate (FPR), che definisce la probabilità di classificare falsamente un virus R5 come X4. Modificando il valore soglia per la classificazione degli FPRs cambia la sensibilità e la specificità per la predizione dei virus X4. Convenzionalmente, il *cut off* utilizzato per RNA estratto da plasma corrisponde al 10%, mentre per i pazienti con HIV-RNA plasmatico non rilevabile il test può essere eseguito su DNA provirale integrato utilizzando però un *cut off* del 20%.

3.5. ANALISI FILOGENETICA

L'analisi filogenetica è volta a studiare le distanze evolutive esistenti tra le sequenze in esame, tali distanze sono rappresentate attraverso alberi filogenetici, che costituiscono dei grafici bidimensionali composti da nodi connessi tra loro tramite rami.

I nodi terminali rappresentano i *taxa* attuali, mentre i nodi interni rappresentano quelli ancestrali.

Le relazioni filogenetiche vengono definite attraverso la topologia dell'albero: la distribuzione dei nodi e la lunghezza dei rami forniscono indicazioni sulla divergenza evolutiva esistente tra i diversi *taxa*, permettendo di individuare gruppi monofiletici e linee evolutive.

L'analisi filogenetica rappresenta, oggi, l'unico metodo affidabile per la tipizzazione delle sequenze, siano esse sottotipi puri o ricombinanti; permette inoltre di esaminare le relazioni genetiche all'interno di un gruppo di sequenze o tra virus provenienti da diverse aree geografiche, fornendo indicazioni epidemiologiche sull'origine e la propagazione dei virus in una popolazione.

Al fine della conduzione di una analisi filogenetica per ceppi di HIV-1 possono essere utilizzate indifferentemente sia sequenze ottenute dopo estrazione da DNA associato alle cellule (DNA provirale) che quelle ottenute da virus libero circolante nel plasma dopo RT-PCR.

3.5.1 Analisi filogenetica dei sottotipi puri e delle CRFs.

Utilizzando il programma BioEdit (ver. 7.0.9.1) [238] le sequenze della regione V3 campioni vengono allineate tra loro e con un numero variabile di sequenze di riferimento disponibili nel database del Los Alamos National Laboratory (LANL) [239], utilizzando, solitamente, da due a cinque ceppi di riferimento per ogni sottotipo puro e CRF.

Le estremità vengono eliminate al fine di ottenere frammenti della medesima lunghezza e l'allineamento viene effettuato utilizzando l'algoritmo Clustal contenuto nel programma, intervenendo con un editing manuale ove necessario. In questo modo vengono costruiti i dataset di sequenze utilizzati per le successive analisi di tipizzazione e di ricombinazione.

Ogni dataset viene analizzato utilizzando i programmi SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOR e CONSENSE contenuti nel pacchetto software PHYLIP (ver. 3.69). [240]

Il rapporto transizione/transversione viene calcolato per ogni specifico dataset con il programma TreePuzzle (ver. 5.2) [241] e utilizzato per calcolare le distanze genetiche tra le sequenze sottomesse mediante opportuni modelli evolutivisti di differente complessità.

Il programma DNADIST calcola le distanze genetiche tra le sequenze di ogni dataset, generando una matrice numerica utilizzata dal programma NEIGHBOR per generare l'albero filogenetico reale, in cui le lunghezze dei rami rispecchiano le effettive distanze evolutive tra i taxa. Il programma NEIGHBOR può utilizzare algoritmi diversi per i suoi calcoli.

La funzione del programma SEQBOOT è quella di creare dei replicati delle sequenze in esame, in modo da ottenere un supporto statistico dell'affidabilità e attendibilità dell'albero filogenetico generato. Il programma produce una serie di dataset replicati, composti dallo stesso numero di sequenze dell'originale ma in cui le colonne sono una combinazione con ripetizione di quelle iniziali. In questo modo è possibile valutare se l'albero reale generato rimane invariato anche considerando solo parti delle sequenze in studio.

I replicati sono sottoposti alle stesse analisi del dataset iniziale e i dati generati vengono valutati complessivamente dal programma CONSENSE, il quale crea infine un albero filogenetico che rappresenta il consenso di tutti quelli replicati. In quest'albero, sono indicati dei valori, definiti di bootstrap, che rappresentano la frequenza con cui ogni diramazione è presente, esattamente nella stessa topologia, in tutti gli alberi replicati. Valori di bootstrap uguali o superiori al 70% sono considerati statisticamente significativi e convenzionalmente sono ritenuti indicativi di una ramificazione attendibile; questo valore soglia è tuttavia arbitrario e può variare a seconda della complessità e numerosità delle sequenze in esame.

3.6 ANALISI BAYESIANA

Il programma MrBayes (ver. 3.1.2), utilizzato per la costruzione degli alberi si fonda sulle teorie della statistica Bayesiana, che calcola la probabilità a posteriori dell'albero (ovvero la probabilità di ottenere un certo albero in base ai dati forniti), diversamente da quanto avviene nel Maximum Likelihood, che ricerca la miglior likelihood dell'albero (ovvero la probabilità di ottenere i dati in base all'albero generato). La probabilità a posteriori è così calcolata, secondo le teorie Bayesiane, a partire dalla probabilità a posteriori dell'analisi filogenetica e dalla likelihood dell'albero.

Le probabilità a posteriori stimate vengono approssimate mediante l'algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Inizialmente viene generato uno *starting tree* casuale che viene poi confrontato con un nuovo albero ottenuto modificando in modo sistematico il precedente e i relativi parametri; il secondo albero viene quindi accettato o rifiutato sulla base della probabilità a posteriori in uno specifico processo di campionamento. Questo sistema di confronto viene ripetuto a catena fino a ottenere l'albero con il più alto prodotto di probabilità a posteriore nodale tra tutti quelli generati (definito *consensus tree* o *maximum clade credibility tree*). In questo modo si ottiene una stima della significatività dei cluster dell'albero, fornendo così dei valori con supporto statistico. Gli alberi ottenuti sono stati visualizzati ed editati con il software FigTree v1.4.

3.7 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei dati è stata elaborata con il software XLSTAT 2013 v4.03, modulo integrabile in Excel.

All'interno delle due coorti separate la differenza della distribuzione di ciascuna variabile numerica nei due gruppi R5 e X4 e le relative significatività sono state valutate mediante test U di Mann-Whitney. Alla variabile categoriale del successo virologico a sei mesi e dodici mesi è stato invece applicato il test esatto di Fisher.

L'analisi dei determinanti di successo virologico ed immunologico, intesi rispettivamente come soppressione della carica virale sotto il limite di detezione delle 37 cp/mL e il numero assoluto di cellule CD4+ recuperate dal baseline ai 6 mesi e ai 12 mesi nel corso della terapia, è stata eseguita tramite modello multivariato ANCOVA (analisi della covarianza), una misura di quanto ciascuna variabile esplicativa influenzi la variabile risposta, indipendentemente dall'effetto delle altre variabili esplicative. I modelli di regressione elaborati sulle variabili di risposta di successo virologico e recupero immunologico a sei e a dodici mesi sono stati applicati nei confronti sia dei pazienti AIDS presenters che dei pazienti con infezione acuta/recente.

3.7.1. Analisi dei parametri immuno-virologici

All'interno di ciascuna coorte, si è proceduto all'analisi dei diversi parametri immuno-virologici posti in relazione al tropismo iniziale del virus.

Nel particolare, sono state analizzate queste variabili: HIV-RNA plasmatico e linfociti T CD4+ (in conta assoluta e percentuale) rilevati al baseline, ai 6 e ai 12 mesi; linfociti T CD8+ (in conta assoluta) e rapporto CD4+/CD8+ al baseline; zenith di HIV-RNA (il valore più alto rilevato) e nadir di linfociti T CD4+ (il valore più basso rilevato).

3.7.2 Valutazione della relazione tra la predizione del tropismo genotipico e i parametri immuno-virologici.

La prevalenza di pazienti con tropismo X4 ed R5 è stata valutata prendendo in considerazione il numero di cellule CD4 e il valore di FPR sia al baseline (tempo 0), al tempo t6 ed infine al tempo t12.

La valutazione è stata effettuata considerando un numero di CD4 ≤ 200 , 200-350, 350-500, >500 cells/mm³ ed un FPR al baseline ≤ 2 , 2-10, >10 ; al t6 un FPR ≤ 2 , 2-10, 10-20, >20 , al t12 un FPR 2-10 e >20 . Le differenze di proporzione di pazienti X4 ed R5 con differenti range di CD4 e di FPR sono stati valutati utilizzando il Cochran-Armitage trend test.

Particolare attenzione è stata posta ai pazienti in stadio di AIDS, aventi un numero di CD4 ≤ 200 cellule/mm³. Il rischio di essere in uno stadio avanzato della malattia nei nostri pazienti è stato valutato considerando diversi FPR: FPR 2-10 vs. FPR >10 ; FPR ≤ 10 vs. FPR >10 . Il rischio è stato calcolato come odds ratio (OR) con un intervallo di confidenza (CI) pari al 95%.

4. RISULTATI

Dai pazienti arruolati sono state ottenute le sequenze V3 di gp120 al baseline e per i successivi follow up. Esse sono state sottoposte ad analisi con l'algoritmo bioinformatico geno2pheno[coreceptor] per la determinazione del tropismo virale e confrontate con la sequenza consensus, basata sulla predominanza dei polimorfismi nel sottotipo B, con i risultati presentati di seguito.

Tabella 1 Acuti/Recenti: confronto sequenze V3 al baseline

B Cons	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	FPR	
AICL	.	A	T	K	.	F	.	I	.	S	22,60%	R5
BLAR	.	I	R	Q	.	H	A	.	D	19,60%	R5
CAAL	.	K	.	G	D	A	I	N	D	V	K	5,10%	X4
CAMG	G	.	M	.	.	G	.	.	A	.	.	.	D	K	35,10%	R5
CASE	.	I	X	L	Q	.	.	A	L	D	K	76,60%	R5	
CAST	.	.	.	S	T	.	.	V	S	V	.	.	K	.	D	.	.	N	.	K	.	Y	.	.	.	3,80%	X4	
COLU	T	.	.	.	R	Q	T	.	.	A	.	D	A	99,10%	R5	
FRMI	G	.	N	A	.	S	67%	R5
LARO	Q	.	M	Q	L	.	F	L	.	D	.	.	V	33%	R5	
BSI	X+	X-	.	X	.	X	X	X	.	X	X	.	X	.	.	X+	.	Y	.	.	.	4,60%	X4	
MAFA	A	.	D	52,10%	R5
MEED	G	T	.	.	A	S	82,90%	R5	
CAVI	A	E	G	7,90%	X4	
PASI	A	A	.	.	.	N	.	K	.	Y	.	.	.	17,10%	R5	
PAAL	.	K	.	G	D	A	I	N	.	V	.	.	.	K	.	.	.	4,60%	X4	
POSA	R	A	A	N	D	V	Y	.	.	61,10%	R5	
ROPA	S	A	.	D	42,20%	R5
SCMA	A	.	D	52,10%	R5
TOML	P	M	.	.	G	.	L	.	V	.	.	A	.	.	N	77,60%	R5	
TUPA	A	.	D	52,10%	R5	

Tabella 2 AIDS presenters: confronto sequenze V3 al baseline

B cons	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	FPR	
AGAN	A	V	Y	F	T	Y	.	.	A	D	K	.	.	E	.	.	.	R	.	Y	.	1,70%	X4
ANMI	S	Q	F	A	.	.	D	.	.	.	T	85,80%	R5
BAAL	.	.	.	G	S	L	.	F	.	.	T	L	.	A	.	D	50,20%	R5
BOFA	A	.	L	D	91,70%	R5
DEAC	.	I	N	A	.	D	72%	R5
ESMF	.	E	M	.	.	K	.	Y	D	R	.	Y	.	.	.	4,70%	X4
FADE	.	.	.	S	X+	M	X	X	.	.	.	F	A	.	D	R	35,60%	R5	
FEDI	.	X-	.	S	.	.	X+	.	R	G	G	K	.	X	.	.	.	5,30%	X4
FIMA	M	.	A	.	.	I	.	N	N	Y	.	.	4,80%	X4
JSJM	G	.	.	A	.	.	D	66,60%	R5	
LACA	M	.	F	.	K	.	I	.	.	.	A	.	.	.	N	5,30%	X4	
MAAN	M	Q	L	.	F	.	.	L	.	.	.	D	V	9,60%	X4	
NOAR	G	T	.	A	72,10%	R5	
SAAL	N	Q	42,20%	R5	
SACO	M	.	R	K	.	K	T	.	D	A	.	A	Y	.	.	5,40%	X4	
ZEAL	.	I	P	I	.	A	.	D	A	.	Y	.	.	73,10%	R5	

Tabella 3 Pazienti Acuti/Recenti: evoluzione individuale delle sequenze

time		B Cons point																	FPR																				
		C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	FPR		
CAAL	t_0	.	K	.	.	G	D	A	I	N	D	V	K	.	.	.	5,10%	X4	
CAAL	t_12	A	.	.	D	52,10%	R5
CASE	t_0	.	I	X+	L	.	.	Q	.	.	A	L	.	D	K	76,60%	R5	
CASE	t_6	R	A	.	.	D	1,70%	X4
COLU	t_0	T	.	.	R	.	.	.	Q	T	.	A	.	.	D	A	96,50%	R5	
COLU	t_12	A	.	.	D	52,10%	R5	
FRMI	t_0	G	.	N	A	.	.	S	67%	R5	
FRMI	t_6	G	.	N	A	.	.	S	67%	R5	
FRMI	t_12	G	.	N	A	.	.	S	67%	R5	
LARO	t_0	Q	.	M	Q	L	.	F	.	.	L	.	.	.	D	V	33%	R5	
LARO	t_6	Q	.	M	Q	L	.	F	.	.	L	.	.	.	D	V	29,20%	R5	
LARO	t_12	Q	.	M	Q	L	.	F	.	.	L	.	.	.	D	V	33%	R5	
LARO	t_18	.	X	Q	.	M	Q	L	.	F	.	.	L	.	.	.	D	V	21%	R5	
LOSI	t_0	X+	X-	.	X	.	X	.	.	.	X	X	.	.	X	X	X+	.	Y	4,60%	X4		
LOSI	t_6	A	.	.	D	52,10%	R5	
LOSI	t_12	M	.	F	A	Y	.	6,80%	X4	
MAFA	t_0	A	.	.	D	52,10%	R5	
MAFA	t_12	A	.	.	D	52,10%	R5	
PAVI	t_0	A	.	E	G	7,90%	X4	
PAVI	t_6	A	.	E	G	.	.	X-	8,50%	X4	
PASI	t_0	A	A	N	.	K	.	Y	17,10%	R5		
PASI	t_6	A	A	N	.	K	.	Y	17,10%	X4		
PAAL	t_0	.	K	.	.	G	D	A	I	N	.	V	K	.	.	.	4,60%	X4		
PAAL	t_12	Q	.	M	Q	L	.	F	.	.	L	.	.	.	D	V	33%	R5		
TOML	t_0	P	M	.	.	G	.	L	.	V	.	A	.	.	N	77,60%	R5		
TOML	t_6	P	M	.	.	G	.	L	.	V	.	A	.	.	N	77,60%	R5		
TOML	t_12	P	M	.	.	G	.	L	.	A	I	.	A	.	.	N	95,80%	R5		
TUPA	t_0	A	.	.	D	52,10%	R5	
TUPA	t_6	A	.	.	D	52,10%	R5	
TUPA	t_12	A	.	.	D	52,10%	R5	

Nel contesto dell'infezione acuta emergono 5 pazienti cosiddetti “switchers” (cambio del tropismo da R5 ad X4 e viceversa). In particolare, in due casi il passaggio avviene da un tropismo iniziale di tipo X4 a uno di tipo R5 ai successivi *follow up*, in entrambi i casi con la presenza di mutazione in posizione 25. In due casi avviene il passaggio opposto da R5 a X4, ma solo in un caso questo cambio del tropismo è associato alla nota mutazione in posizione 11, nel secondo caso osservando attentamente la sequenza e il relativo FPR, si può attribuire lo “switch” ad un artificio dettato dall'elevazione della soglia scelta come *cut off* per la discriminazione degli X4 dagli R5 (necessaria per il passaggio all'estrazione di

DNA a causa della negativizzazione della carica virale del paziente), in quanto non vi è evidenza di mutazione alcuna e il valore dell’FPR del paziente rimane il medesimo.

Infine, nell’ultimo paziente, il passaggio si verifica in entrambe le direzioni, con una presenza intermittente di varianti R5 e X4, associata a mutazioni in posizione 11 e 25.

Tabella 4 Pazienti AIDS *presenters*: evoluzione individuale delle sequenze

B cons	time point	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	FPR	
ANMI	t_0	S	Q	F	A	.	.	D	T	85,80%	R5
ANMI	t_6	S	S	.	.	F	A	.	.	D	V	.	.	.	T	73,70%	R5
ANMI	t_12	P	M	.	.	G	.	L	.	V	.	.	A	.	.	.	N	77,60%	R5
BAAL	t_0	G	S	L	.	F	.	.	T	L	.	A	.	.	D	50,20%	R5
BAAL	t_6	G	S	L	.	F	.	.	T	L	.	A	.	.	Q	35,80%	R5
BAAL	t_12	A	.	.	D	52,10%	R5
BOFA	t_0	A	.	L	D	91,70%	R5
BOFA	t_6	G	.	.	.	A	.	R	A	.	L	D	98,40%	R5
FADE	t_0	S	X+	M	X	X	F	A	.	.	D	R	.	.	.	35,60%	R5	
FADE	t_6	S	M	.	F	F	A	.	.	D	R	.	.	.	12,80%	X4	
FADE	t_12	S	P	M	A	F	A	.	.	D	R	40,20%	R5	
JSJM	t_0	G	.	.	.	A	.	.	D	66,60%	R5
JSJM	t_6	G	A	.	.	D	Y	.	.	60,10%	R5
LACA	t_0	M	.	F	.	K	.	I	.	.	.	A	.	.	.	N	5,30%	X4	
LACA	t_6	M	.	F	.	.	V	I	.	A	.	A	4%	X4	
LACA	t_12	T	.	F	.	.	V	I	.	A	.	A	.	.	.	N	2,40%	X4	
MAAN	t_0	M	Q	L	.	F	.	.	.	L	.	.	.	D	.	.	.	V	9,60%	X4	
MAAN	t_6	P	A	.	.	D	K	.	Y	.	65,90%	R5
SAAL	t_0	N	Q	42,20%	R5	
SAAL	t_6	R	.	T	M	V	L	.	.	.	Q	K	.	Y	.	.	1,10%	X4	
SACO	t_0	M	.	R	K	.	K	T	.	D	A	.	A	Y	.	.	5,40%	X4
SACO	t_6	M	.	.	.	K	T	.	.	A	T	.	G	X+	.	.	.	71,50%	R5	

Analogamente al caso precedente, è possibile anche all’interno della coorte degli AIDS *presenters* descrivere dei pazienti *switchers*, 4 in totale, con andamenti paragonabili a quelli già osservati in un caso, in seguito a mutazione nelle posizioni 11/25, il paziente passa da un tropismo R5 a un tropismo X4; nel secondo caso, abbiamo evidenza del non ancora raggiunto equilibrio tra le due varianti, con apparizione e successiva regressione della variante X4, associata a mutazione in posizione 13; infine, in due casi avviene il passaggio inverso da R5 a X4.

Dall'analisi delle sequenze mostrate è possibile determinare la distribuzione delle sostituzioni aminoacidiche derivate da mutazioni a livello della regione V3 con i casi nei quali esse abbiano comportato delle variazioni di carica, influenti per le possibili ripercussioni sul tropismo virale.

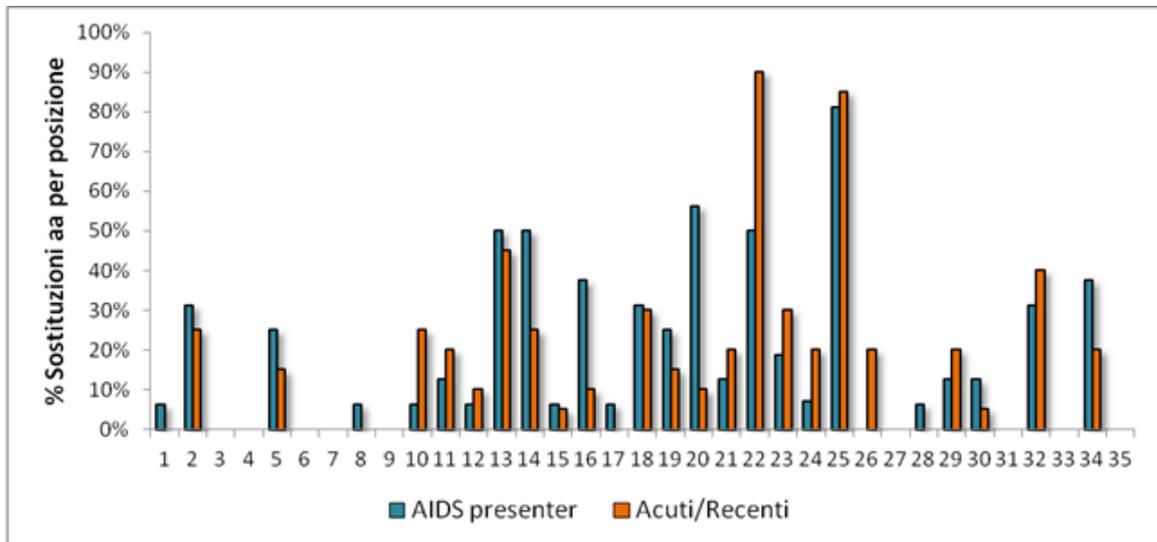


Figura 13 Confronto delle sostituzioni aminoacidiche nelle sequenze baseline rispetto alla sequenza consensus tra pazienti Acuti/Recenti ed AIDS presenters

Il grafico in figura 13 evidenzia l'estrema variabilità di questa regione, in entrambe le coorti. E' noto infatti, che il gene *env* possiede il maggior tasso di variabilità rispetto alle altre regioni del genoma di HIV. [242,243,244]

Si nota tuttavia come le mutazioni dei pazienti in stadio di AIDS tendano a distribuirsi più estesamente sulla regione V3, interessando un numero maggiore di posizioni (25/35) rispetto ai pazienti in con infezione acuta/recente, che mostrano invece una tendenza a concentrare le mutazioni su un ventaglio di posizioni più ristretto (22/35).

In secondo luogo, ai due estremi del dominio V3, che vanno a ripiegarsi per formarne la base, la variazione risulta minimale, con un tasso di mutazioni che rimane comunque maggiore negli AIDS *presenters* rispetto ai soggetti con infezione acuta.

Prendiamo in considerazione le mutazioni più frequenti a carico del dominio V3, la mutazione in posizione 11 e la mutazione in posizione 25. In entrambe le posizioni si osserva una pressoché equa rappresentazione da parte di entrambi i bracci considerati.

Si osserva che la regione tende a mutare centralmente, in corrispondenza della corona, con un picco associato alla posizione 22, nei pazienti con infezione acuta/recente.

Da ultimo, possiamo osservare che anche il numero mutazioni a carico del motivo conservato GPGR (15-18) che occupa la corona di V3 risulta esiguo in entrambi i bracci del nostro campione, come riportato da precedenti studi.



Figura 14. Rappresentazione del tropismo al baseline in Acuti/Recenti (A) ed AIDS presenters (B).

Come atteso, le popolazioni virali X4 rappresentano una fetta molto più consistente nella coorte AIDS presenters (44%) in Figura 14 A rispetto alla coorte dei pazienti con infezione acuta/recente (25%), Figura 14 B dove la trasmissione di varianti R5 risulta prevalente.

4.1 ANALISI DI ULTRADEEP SEQUENCING IN RELAZIONE ALL'ANALISI GENOTIPICA DEL TROPISMO VIRALE.

Con i risultati ottenuti dall'analisi di Ultradeep Sequencing (*Centre for Excellence in HIV/AIDS, University of British Columbia, Vancouver*) sui medesimi campioni dei pazienti arruolati nel nostro studio è stato possibile fare un confronto con i risultati ottenuti con il nostro metodo di sequenziamento di popolazione. E' degno di nota che, non abbiamo ancora tutti i risultati relativi ad i nostri pazienti, ma solo di alcuni al baseline.

In tabella 5A sono rappresentati i risultati ottenuti dall'analisi Ultradeep sequencing dei nostri pazienti al baseline, mentre in tabella 5B i risultati ottenuti dal sequenziamento di popolazione.

Tabella 5A. Analisi di Ultradeep sequencing.

Codice paziente	Percentuale di varianti non R5	Tropismo
ANMI	0,99	R5
CAAL	1,03	R5
COLU	0	R5
LARO	0,05	R5
LACA	1,81	R5
MAFA	0,43	R5
PAAL	1,93	R5
TOML	0	R5
FRMI	0,130	R5

Tabella 5B. Analisi del sequenziamento di popolazione.

Codice paziente	FPR	Tropismo
ANMI	85,80%	R5
CAAL	5,10%	X4
COLU	96,50%	R5
LARO	33%	R5
LACA	5,30%	X4
MAFA	52,10%	R5
PAAL	4,60%	X4
TOML	77,60%	R5
FRMI	67%	R5

Andando a confrontare le due diverse analisi è possibile riscontrare delle differenze, in particolare prendendo in considerazione il paziente CAAL, secondo l'analisi ultradeep sequencing ha un tropismo R5 con una percentuale di varianti non R5 pari 1,03% mentre dalla nostra analisi risulta un tropismo X4 con un FPR pari al 5,10%.

Il paziente LACA secondo l'ultradeep sequencing presenta un tropismo R5 con una percentuale di varianti non R5 pari 1,81%, mentre dalla nostra analisi risulta un tropismo X4 con un FPR pari al 5,30%.

Il paziente PAAL secondo l'ultradeep sequencing presenta un tropismo R5 con una percentuale di varianti non R5 pari 1,93%, mentre dalla nostra analisi risulta un tropismo X4 con un FPR pari al 4,60%.

In questi 3 soggetti la percentuale di varianti non R5 evidenziata dall'Ultradeep sequencing e' risultata superiore all'1%. Questo elemento ha coinciso con la determinazione di un ceppo non R5 (FPR <10%) secondo la sequenza di popolazione. Possiamo concludere che il metodo del sequenziamento di popolazione da noi utilizzato permette una determinazione qualitativa del tropismo virale e ricostruisce l'evoluzione di V3 a livello della sequenza prevalente in ciascun individuo, con il limite di non rilevare eventuali varianti minoritarie non-R5. Queste varianti minoritarie possono venire selezionate, in special modo dalla terapia con antagonisti del corecettore CCR5, ed emergere successivamente, oppure varianti a diverso tropismo potrebbero evolvere dalle preesistenti tramite varie vie di mutazione.

Dall'analisi delle sequenze mostrate è possibile determinare la distribuzione delle sostituzioni aminoacidiche derivate da mutazioni a livello della regione V3 con i casi nei quali esse abbiano comportato delle variazioni di carica, influenti per le possibili ripercussioni sul tropismo virale.

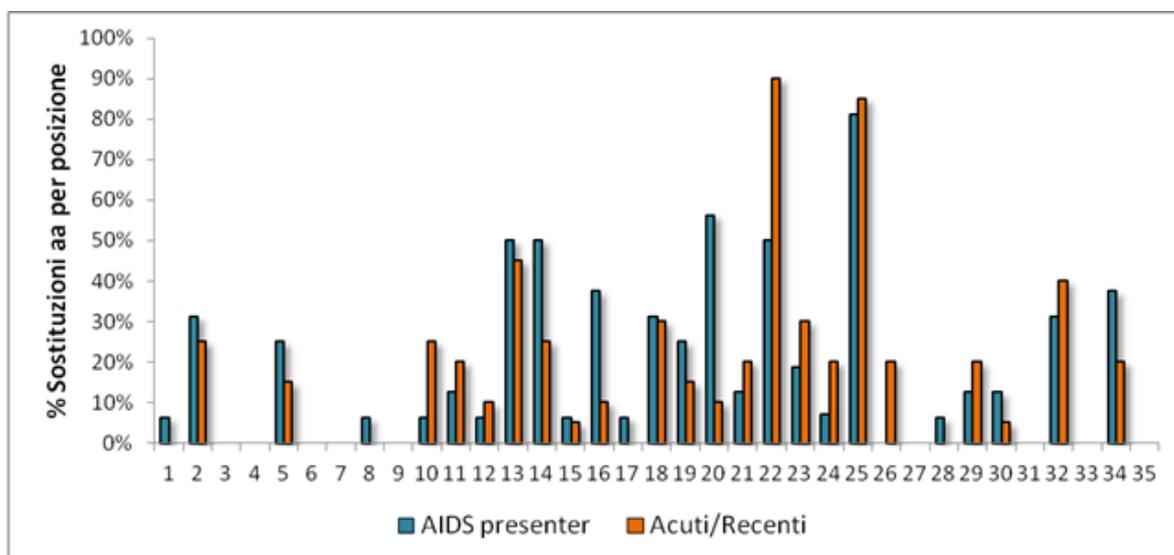


Figura 15. Confronto delle sostituzioni aminoacidiche nelle sequenze baseline rispetto alla sequenza consensus tra pazienti Acuti/Recenti ed AIDS presenters

Quello che si evidenzia dal grafico in primo luogo è che è evidente l'estrema variabilità di questa regione, in entrambe le coorti. E' noto infatti, che il gene *env* possiede il maggior tasso di variabilità rispetto alle altre regioni del genoma di HIV. [242,243,244].

Si nota tuttavia come le mutazioni dei pazienti in stadio di AIDS tendano a distribuirsi più estesamente sulla regione V3, interessando un numero maggiore di posizioni (25/35) rispetto ai pazienti in con infezione acuta/recente, che mostrano invece una tendenza a concentrare un numero globalmente maggiore di mutazioni su un ventaglio di posizioni più ristretto (22/35).

In secondo luogo, ai due estremi del dominio V3, che vanno a ripiegarsi per formarne la base, la variazione risulta minimale, con un tasso di mutazioni che rimane comunque maggiore negli AIDS presenters rispetto ai pazienti con infezione acuta.

Prendiamo in considerazione le mutazioni più frequenti a carico del dominio V3, la mutazione in posizione 11 e la mutazione in posizione 25. In entrambe le posizioni si osserva una pressoché equa rappresentazione da parte di entrambi i bracci considerati.

Si osserva che la regione tende a mutare centralmente, in corrispondenza della corona, con un picco associato alla posizione 22, nei pazienti con infezione acuta/recente.

Da ultimo, possiamo osservare che anche il numero mutazioni a carico del motivo conservato GPGR (15-18) che occupa la corona di V3 risulta esiguo in entrambi i bracci del nostro campione, come riportato da precedenti studi. [245, 246]

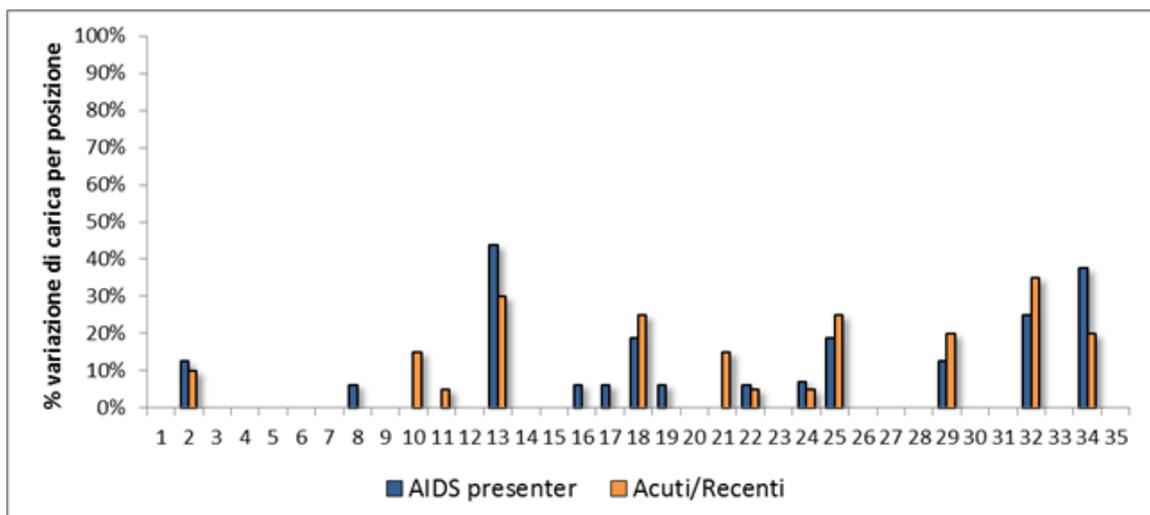


Figura 16 Confronto delle sostituzioni che conferiscono una variazione di carica aminoacidica nelle sequenze baseline rispetto alla sequenza consensus.

Andando invece a considerare la distribuzione della variazione delle cariche nelle sequenze baseline rispetto alla sequenza consensus, notiamo che la tendenza in entrambi i bracci è estesa su tutta la regione V3, in maniera omogenea.

Nei pazienti AIDS presenters la posizione 13 presenta una maggiore variazione di carica (43%), mentre nei pazienti con infezione acuta/recente la posizione con maggior variazione di carica è la 32 (35%). Considerando invece la posizione 11, si riscontra una variazione di carica pari al 5% solo nei pazienti acuti/recenti. La posizione 25 presenta una variazione di carica quasi equa in entrambi i bracci, il 18% nei pazienti AIDS presenters e del 25% nei pazienti con infezione acuta/recente.

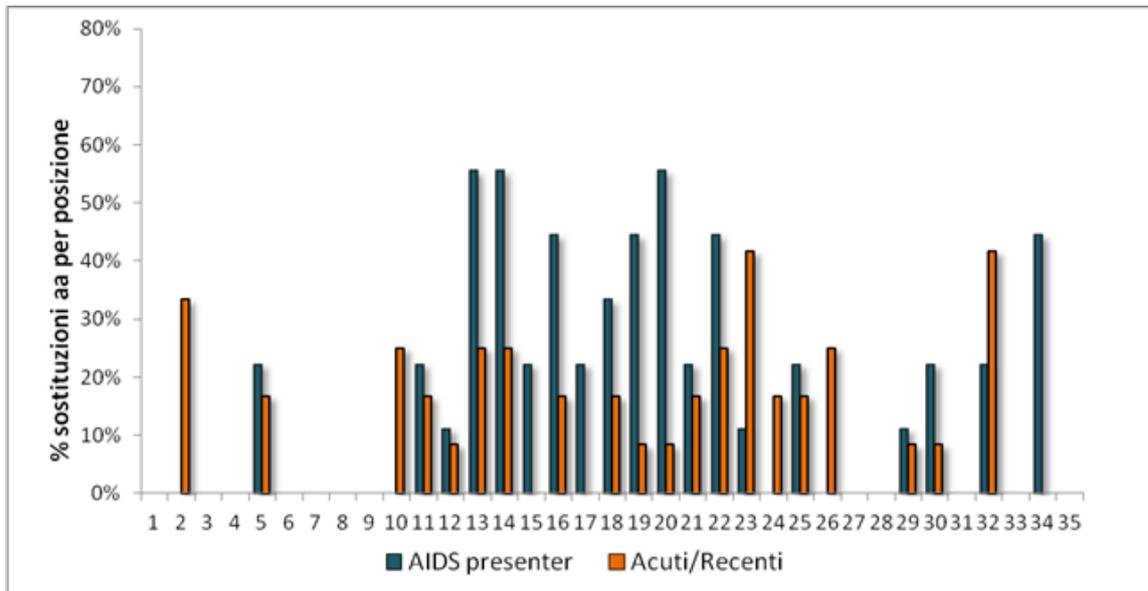


Figura 17. Sostituzioni aminoacidiche occorse nell'evoluzione temporale della sequenza V3 nei singoli pazienti.

Considerando le sostituzioni avvenute seguendo i pazienti nel tempo, il dominio di V3 è interessato per un'estensione maggiore nei pazienti con infezione acuta/recente (20 posizioni aminoacidiche interessate), rispetto agli AIDS presenters che tendono a mutare in maniera più consistente su posizioni più localizzate (19). Rimangono conservate le posizioni 1,3-4,6-9 nelle infezioni acute/recenti e 1,2-4,6-9 negli AIDS presenters. Si conferma la variabilità a livello del motivo GPGR, questa volta maggiore negli AIDS presenters. Le

sostituzioni in posizione 11 e 25 risultano poco rappresentate in entrambe le coorti. Quello che si evidenzia è una più alta percentuale di variazione negli AIDS presenters.

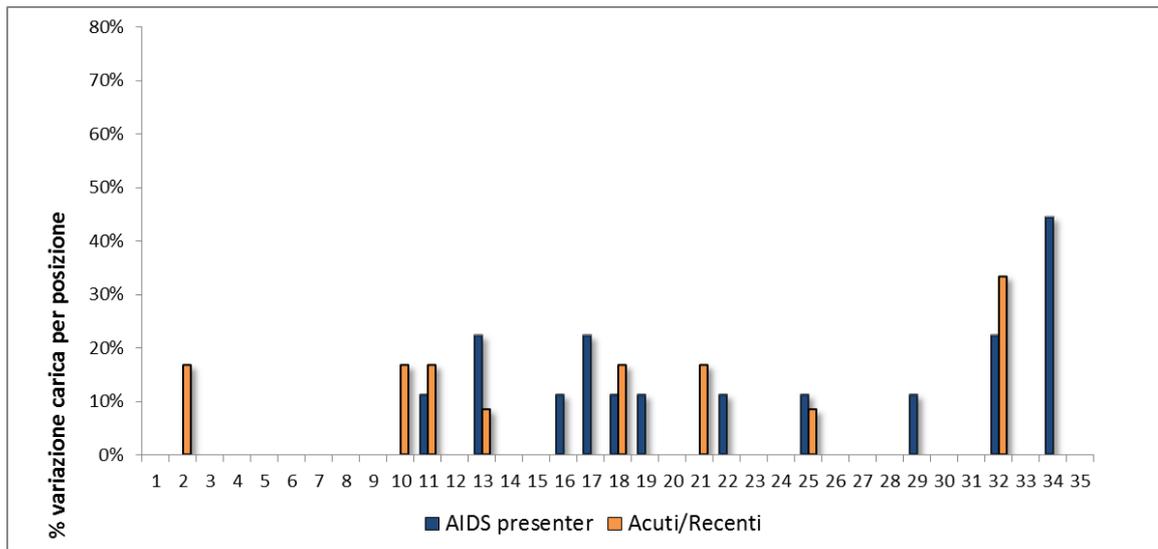


Figura 18. Sostituzioni che conferiscono una variazione di carica aminoacidica nell'evoluzione temporale della sequenza V3 nei singoli pazienti.

Andando a considerare anche questa volta le posizioni in cui le sostituzioni aminoacidiche hanno conferito una variazione di carica nei singoli pazienti, si può osservare anche in questo caso che la variazione di carica è omogenea in entrambi i bracci.

La posizione maggiormente rappresentativa di variazioni di carica nei pazienti AIDS presenters è la posizione 34. Mentre nei pazienti acuti/recenti è la posizione 32 ad essere maggiormente rappresentata.

Si nota inoltre come le posizioni 11 e 25, all'interno del singolo paziente presentano nella quasi totalità dei casi un rilevante impatto sulla variazione in termini di carica della regione.

4.2 ASSEGNAZIONE DEL SOTTOTIPO HIV-1

Le sequenze della regione V3 del gene ENV dei 36 pazienti sono state sottoposte ad analisi filogenetica utilizzando il pacchetto Phylip ed i software Simplot e SplitsTree per la conferma del sottotipo di HIV-1 e per valutare la presenza di ceppi ricombinanti.

Sono state selezionate le sequenze di riferimento provenienti da ceppi puri estratte dal database

Los

Alamos

(<http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html>).

Lo studio dell'evoluzione della pandemia di HIV-1 è importante in quanto la complessità genetica virale può influenzare l'epidemiologia, la patogenesi, la diagnosi, il trattamento e la prevenzione dell'infezione [247,248,249,250,251,252,253]

In figura 19 è riportato l'albero di NJ ottenuto con il pacchetto Phylip sulla base del quale è stata effettuata l'assegnazione del sottotipo.

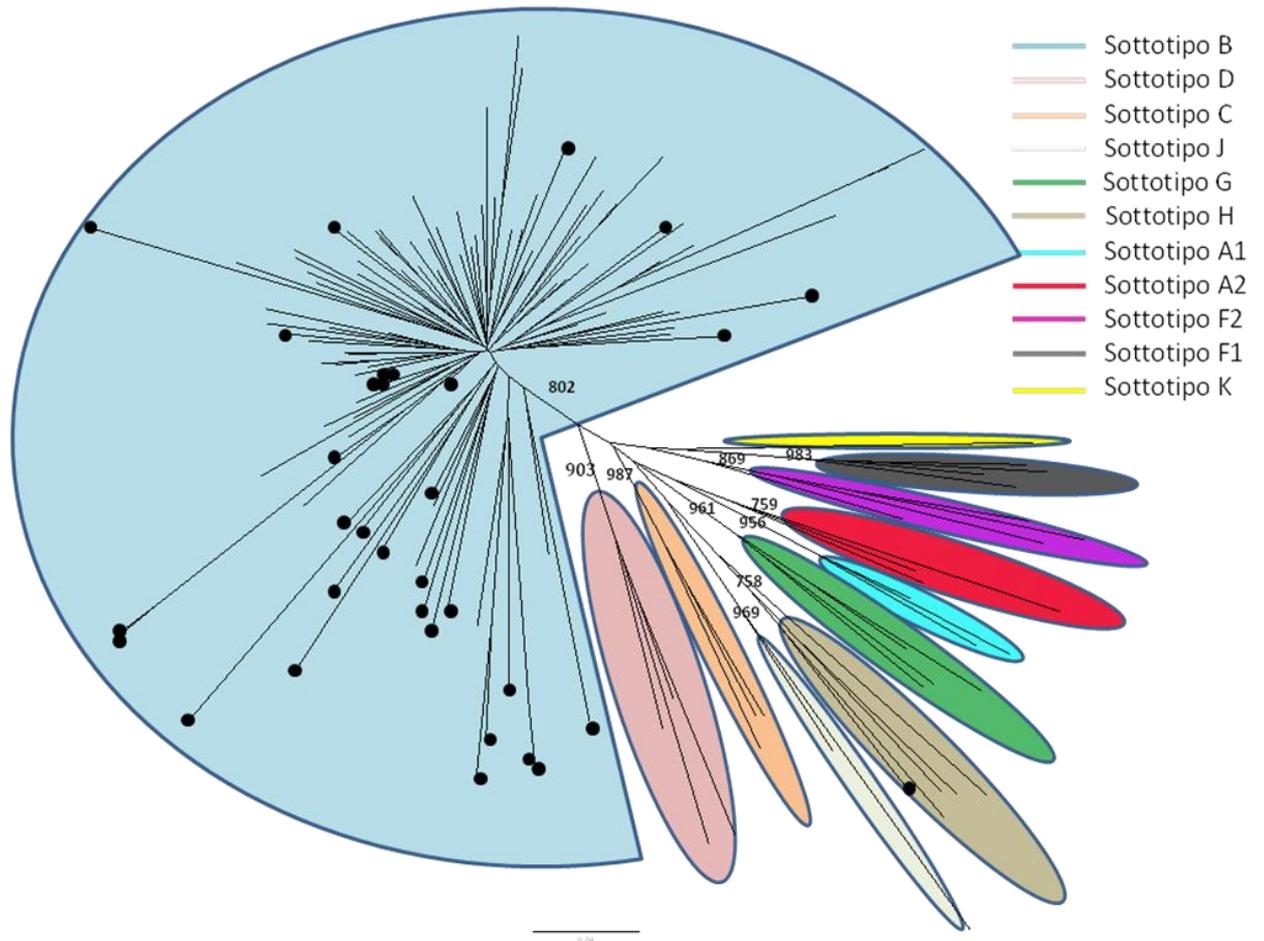


Figura 19. Albero di NJ ottenuto con il pacchetto phylip dei ceppi puri. I diversi colori e gli ovali identificano i differenti sottotipi. I valori di bootstrap superiori al 70% sono indicati per i nodi più importanti. I rami contrassegnati con i pallini neri rappresentano i pazienti studiati.

Per ogni *clade* supportato sono riportati i valori di bootstrap.

Sulla base di tale analisi l'89% (n=32) dei soggetti albergava il sottotipo B ed il 3% un sottotipo G (il paziente BLAR).

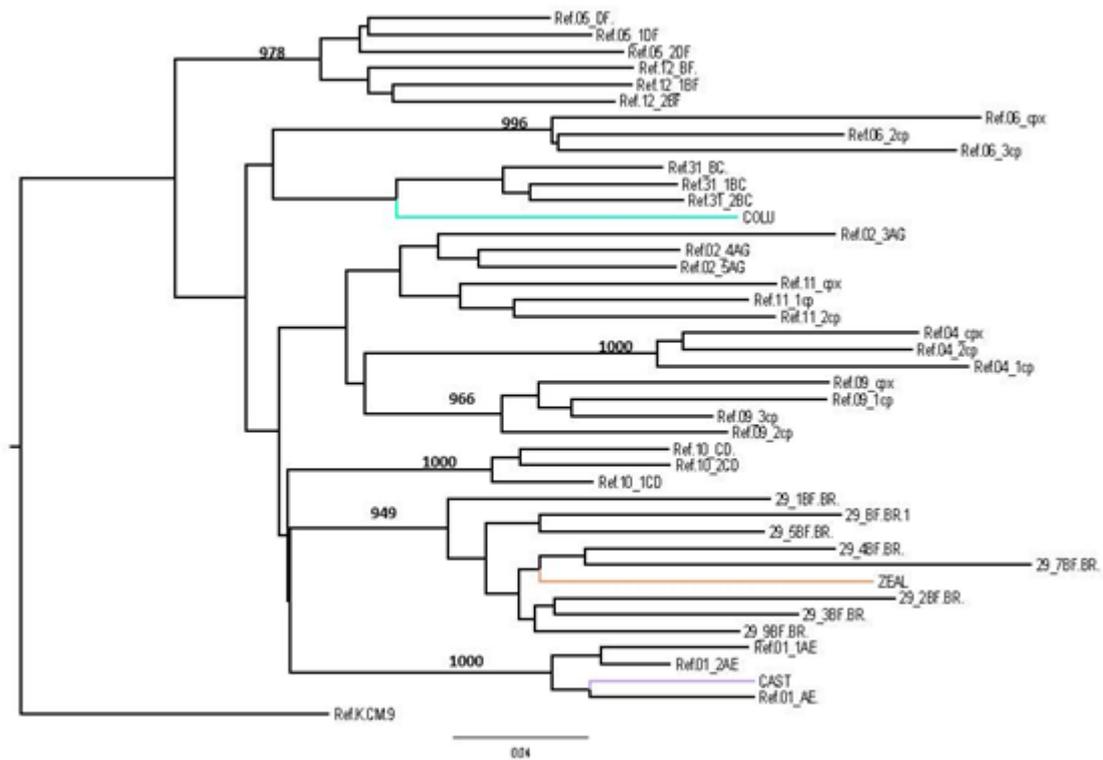


Figura 20. Albero di NJ ottenuto con il pacchetto dei ceppi ricombinati. I pazienti in studio sono indicati con colori differenti. Per i principali nodi interni sono riportati i valori di bootstrap superiori al 70%.

Le sequenze che non sono state assegnate ad un sottotipo virale con il precedente albero sono state quindi nuovamente analizzate per compararle con i ceppi ricombinanti attualmente riconosciuti. Dall'albero possiamo osservare come il paziente COLU sia strettamente correlato alla CRF31_BC ma non possa tuttavia essere assegnato a tale ceppo, situandosi all'esterno del clade formato da tali referenze. La scarsa presenza di sequenze CRF31_BC sul database Los Alamos in riferimento alla regione V3 (solo 3) potrebbero essere la causa della mancata assegnazione a tale ceppo. Il 3% dei soggetti albergava invece una CRF01_AE ed la 3% CRF29_BF.

In totale quindi l'89 % dei pazienti studiati era di sottotipo B, il 2% era costituito da URF non identificata di pattern BF, il 3% era una CRF01_AE, il 3% di sottotipo G ed infine il 3% era una CRF29_BF. Il grafico a torta in Figura 21 fornisce una rappresentazione grafica di tale risultato.

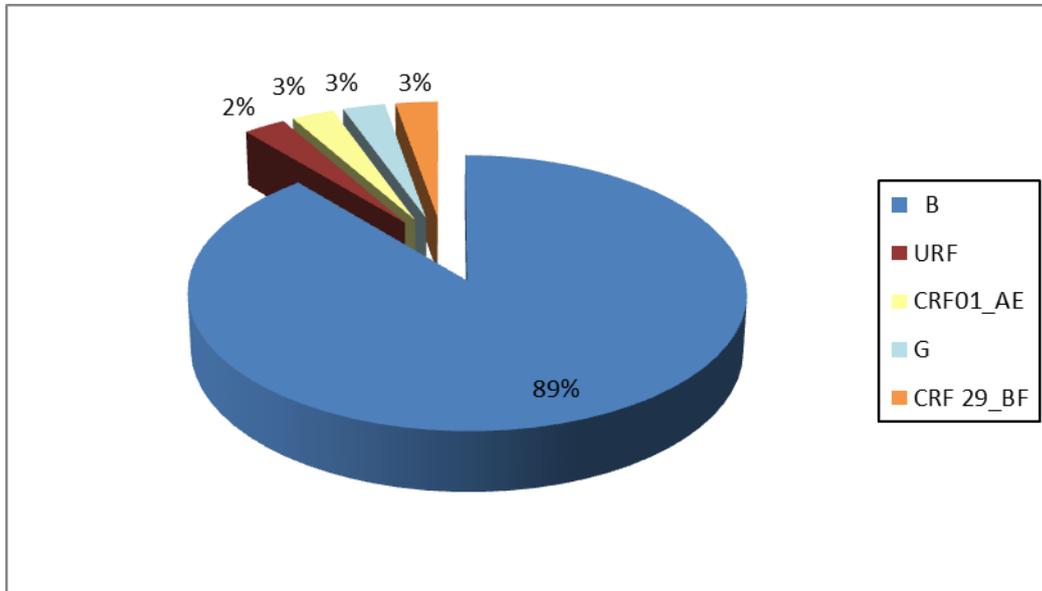


Figura 21. Distribuzione sottotipi HIV in entrambi i bracci.

Nel braccio di pazienti con infezione acuta/recente, come indicato dalla Figura 22, l'85% dei pazienti era di sottotipo B, mentre il 5% albergava la CRF31_BC, il 5% la CRF01_AE ed infine il restante 5% il sottotipo G.

Nel braccio di pazienti AIDS presenters, come descritto dalla figura 22B, il 94% dei pazienti presentava sottotipo B, mentre il 6% era costituito dalla CRF29_BF.



Figura 22. Distribuzione sottotipi HIV in: A. Acuti/recenti; B. AIDS presenter.

4.3 ANALISI FILOGENETICA DI ISOLATI DI SOTTOTIPO B

Per i soli pazienti precedentemente assegnati al ceppo B è stata condotta un'ulteriore analisi mediante il programma MrBayes, utilizzando il modello GTR+I+ Γ (*General-Time Reversible+Invariant sites+Gamma distribution rate*) selezionato mediante il programma ModelTest.

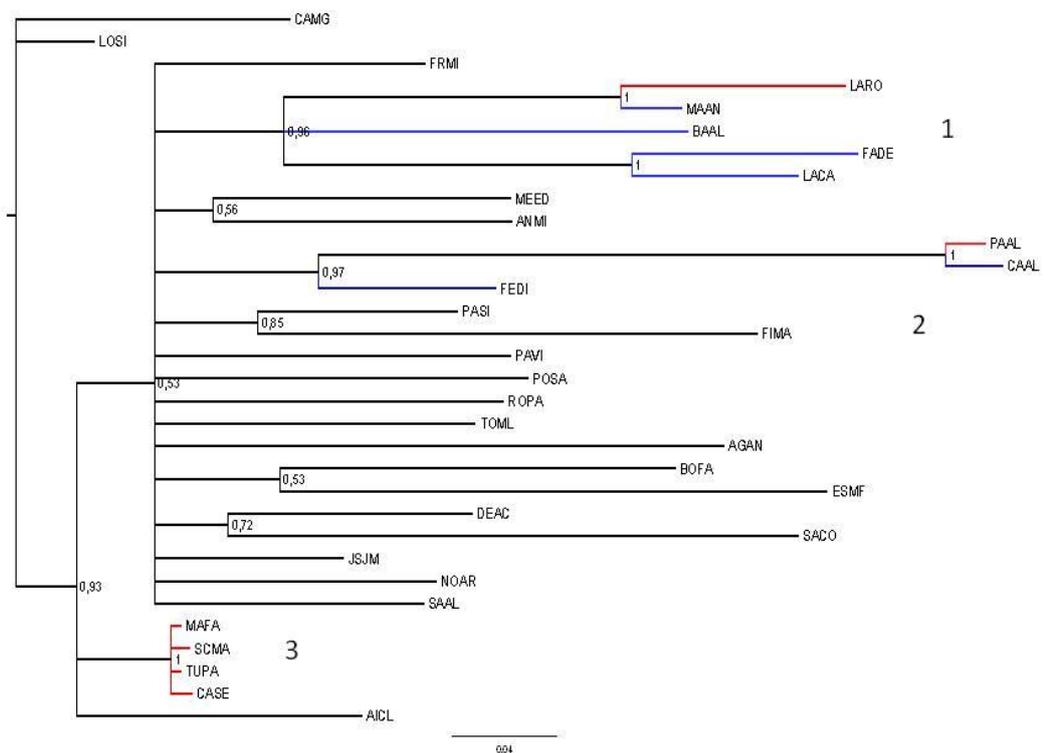


Figura 23. Albero filogenetico delle 32 sequenze di sottotipo B ottenuto con il programma MrBayes.. In rosso si evidenziano le sequenze dei pazienti acuti/recenti, mentre in blu i pazienti AIDS presenter. Per ogni *cluster* supportato sono riportati i valori di probabilità a posteriori.

Sono stati identificati 3 *cluster* altamente significativi con probabilità a posteriori pari ad ≥ 0.97 e contenenti almeno tre sequenze (Figura 23). I *cluster* comprendevano globalmente 12 sequenze (27%) sulle 32 totali. Il cluster più numeroso è risultato essere il cluster 1 che conteneva 5 sequenze.

Dall'albero filogenetico possiamo osservare come nei cluster 1 e 2 vi sia eterogeneità tra pazienti con infezione acuta/recente e AIDS presenters,. Il cluster 3 era invece costituito solo da pazienti con infezione acuta/recente. Per quanto riguarda il fattore di rischio, 4 pazienti dei 5 nel cluster 1 hanno il fattore di rischio eterosessuale mentre il solo paziente con codice LACA presentava un fattore di rischio bisessuale.

Nel cluster 2, 2 pazienti hanno il fattore di rischio omosessuale e rappresentano una coppia di fatto, mentre il terzo paziente (codice FEDI) presenta un fattore di rischio eterosessuale.

Nel cluster 3 due soggetti hanno fattore di rischio omosessuale (codici MAFA e SCMA) sono gli altri due sono eterosessuali (codici TUPA e CASE).

Lo stesso albero è stato quindi analizzato in base all'utilizzo del corecettore come mostrato in figura 24.

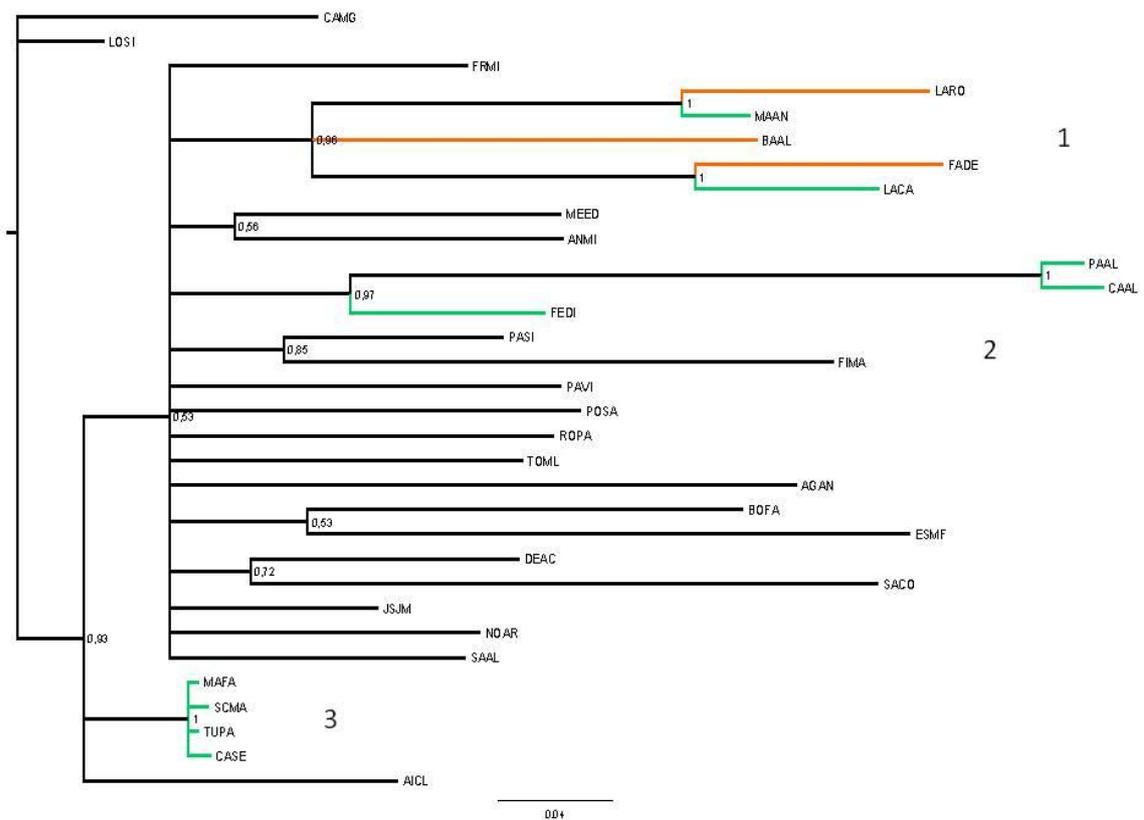


Figura 24. Albero filogenetico delle 32 sequenze di sottotipo B ottenuto con il programma MrBayes. In arancione si evidenziano le sequenze dei pazienti con tropismo R5, mentre in verde i pazienti con tropismo X4. Per ogni *cluster* supportato sono riportati i valori di probabilità a posteriori.

La maggior parte delle sequenze incluse nei cluster hanno tropismo X4, in particolare, mentre nei cluster 2 e 3 sono presenti solo sequenze di pazienti con tropismo X4, nel primo cluster, tre soggetti hanno tropismo R5 e due X4.

4.4 ANALISI DESCRITTIVA

AIDS-presenter (n=16)

	R5 (n=9) 56,25%	X4 (n=7) 43,75%	p
Variabile	Mediana	Mediana	<i>Test Mann-Whitney</i>
vl_0(Log)	4,981	4,606	0,751
vl_6(Log)	1,568	1,568	0,136
vl_12(Log)	1,568	1,568	
vl_zenith(Log)	5,039	4,606	0,341
cd4_0	92,000	137,000	0,491
cd4%_0	0,094	0,112	0,597
cd4_6	236,000	303,000	0,516
cd4%_6	0,226	0,143	0,626
Δ cd4_6	81,000	71,000	1,000
cd4_12	195,000	380,000	0,200
cd4%_12	0,190	0,165	0,773
Δ cd4_12	103,000	209,000	0,386
cd4_nadir	92,000	70,000	0,916
cd8_0	587,500	739,500	0,561
	%	%	<i>Test esatto di Fisher</i>
success6	100,00%	60,00%	0,182
success12	100,00%	100,00%	1,000
Subtype B	88,89%	100,00%	1,000

Tabella 6. Analisi descrittiva dei parametri immuno-virologici nei pazienti AIDS presenters

**Acuti/Recenti
(n=20)**

	R5 (n=15) 75,00%	X4 (n=5) 25,00%	p
	Mediana	Mediana	<i>Test Mann-Whitney</i>
vl_0(Log)	5,512	4,244	0,116
vl_6(Log)	1,568	1,568	1,000
vl_12(Log)	1,568	1,568	
vl_zenith(Log)	5,530	4,693	0,163
cd4_0	443,000	412,000	0,727
cd4%_0	0,192	0,234	0,430
cd4_6	700,500	471,000	0,130
cd4%_6	0,299	0,321	0,828
Δ cd4_6	256,500	114,000	0,613
cd4_12	749,000	722,000	0,813
cd4%_12	0,273	0,320	0,724
Δ cd4_12	256,000	332,500	0,906
cd4_nadir	438,500	412,000	0,431
cd8_0	1557,000	910,000	0,094
	%	%	<i>Test esatto di Fisher</i>
success6	92,31%	75,00%	0,426
success12	100,00%	100,00%	1,000
Subtype B	86,67%	80,00%	1,000

Tabella 7. Analisi descrittiva dei parametri immuno-virologici nei pazienti con infezione acuta/recente.

4.5 ANALISI DEI PARAMETRI IMMUNO-VIROLOGICI

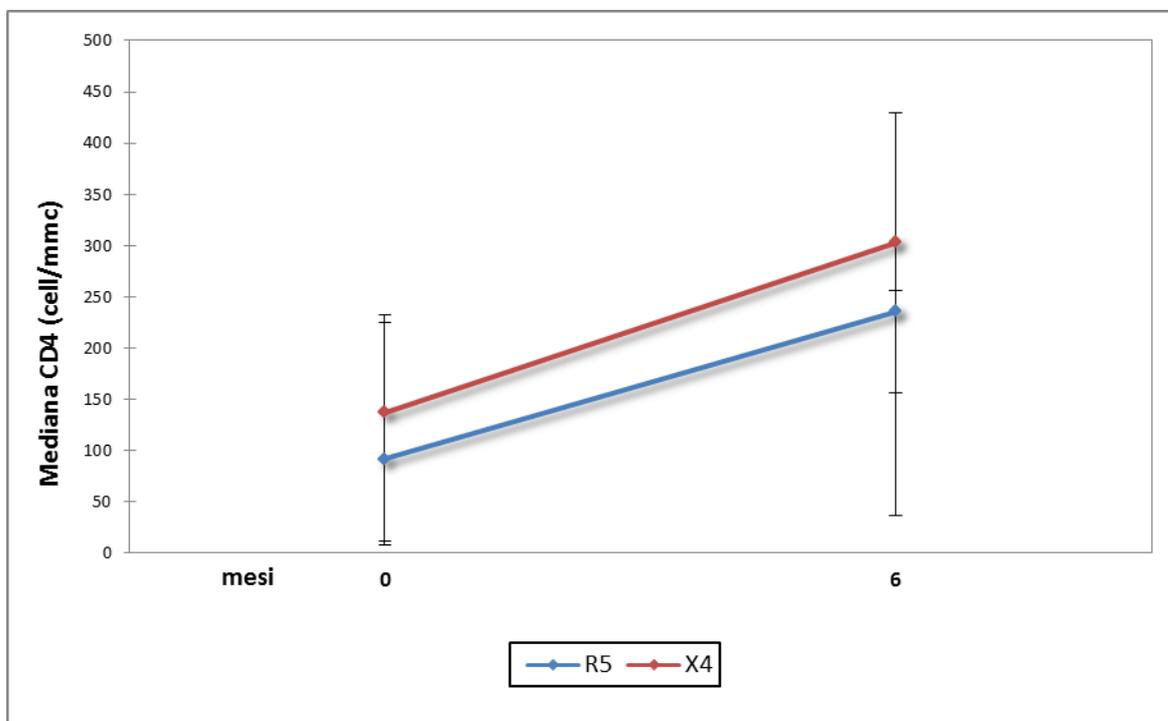


Figura 25. Andamento temporale da zero a sei mesi della conta delle cellule CD4+ nei pazienti con AIDS per diverso tropismo virale R5 o X4

Mediana T CD4+	R5	X4
Mese 0	92,000	137,000
Mese 6	236,000	303,000

IC95 0-R5 (8;225); IC95 0-X4(11;2032) – IC95 6-R5 (37;256); IC95 6-X4(156;430)

Il grafico mette in luce che la popolazione R5 del campione di pazienti AIDS presenters, pur partendo da valori iniziali più bassi di linfociti CD4+, ha una risalita quasi equivalente alla popolazione X4.

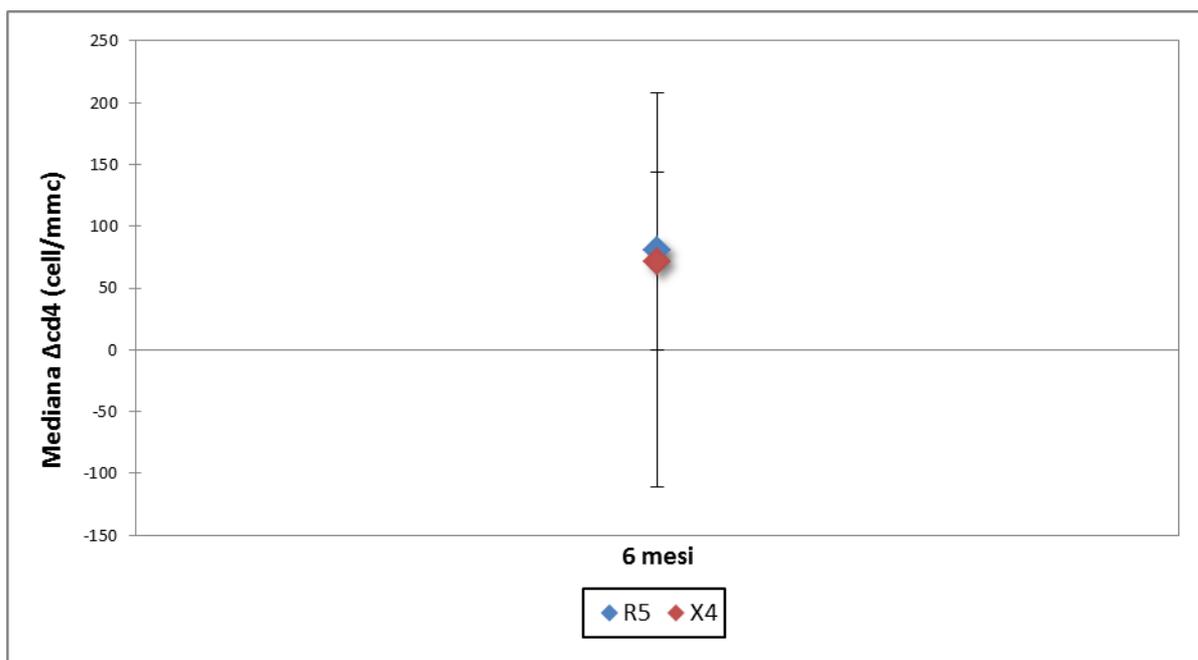


Figura 26. Confronto tra le mediane del recupero di cellule CD4+ da zero a sei mesi nei pazienti con AIDS per diverso tropismo virale R5 o X4.

Δ CD4	R5	X4
6 mesi	81,000	71,000

IC95 R5 (-111;144); IC95 X4(0;208)

Nella figura si riconferma un equivalente recupero immunologico dei pazienti R5 rispetto agli X4 nei primi sei mesi.

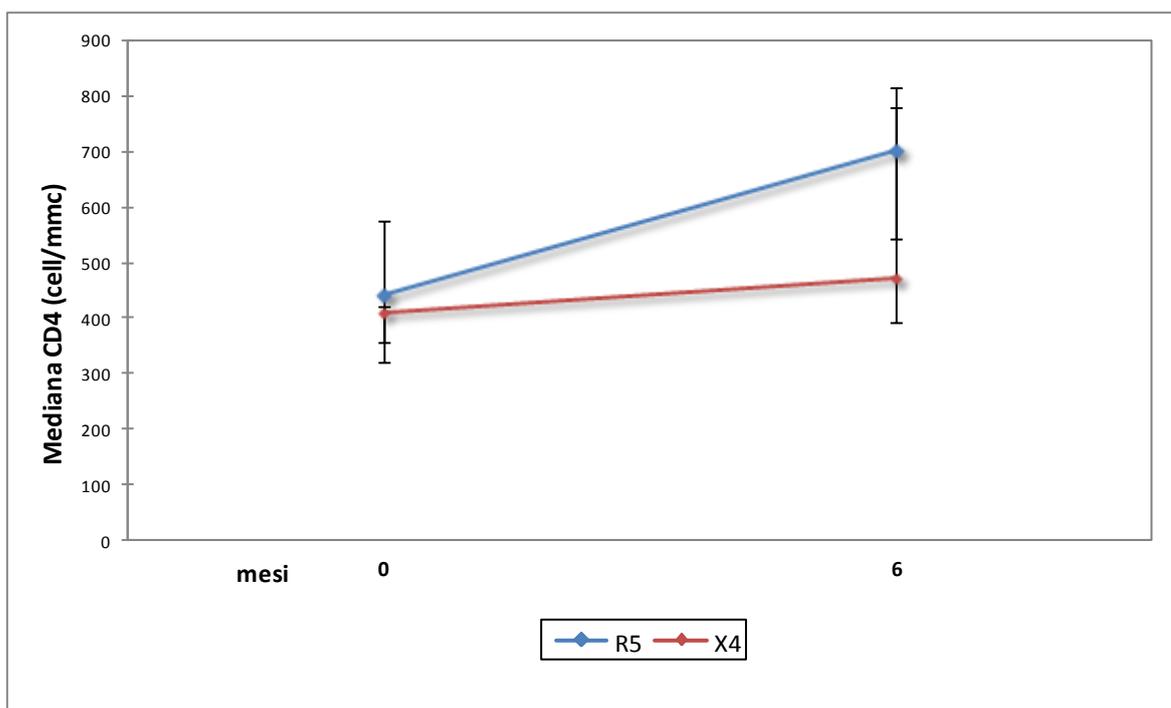


Figura 27. Andamento temporale da zero a sei mesi della conta delle cellule CD4+ nei pazienti con infezione acuta/recente per diverso tropismo virale R5 o X4

Mediana T CD4+	R5	X4
Mese 0	443,000	412,000
Mese 6	700,500	471,000

IC95 0-R5 (322;576); IC95 0-X4(357;422) – IC95 6-R5 (544;815); IC95 6-X4(393;779)

Rispetto alla situazione che si verifica negli AIDS presenters, nei pazienti con infezione acuta/recente si evidenzia una netta divergenza nel recupero immunologico dei pazienti a tropismo R5 rispetto agli X4.

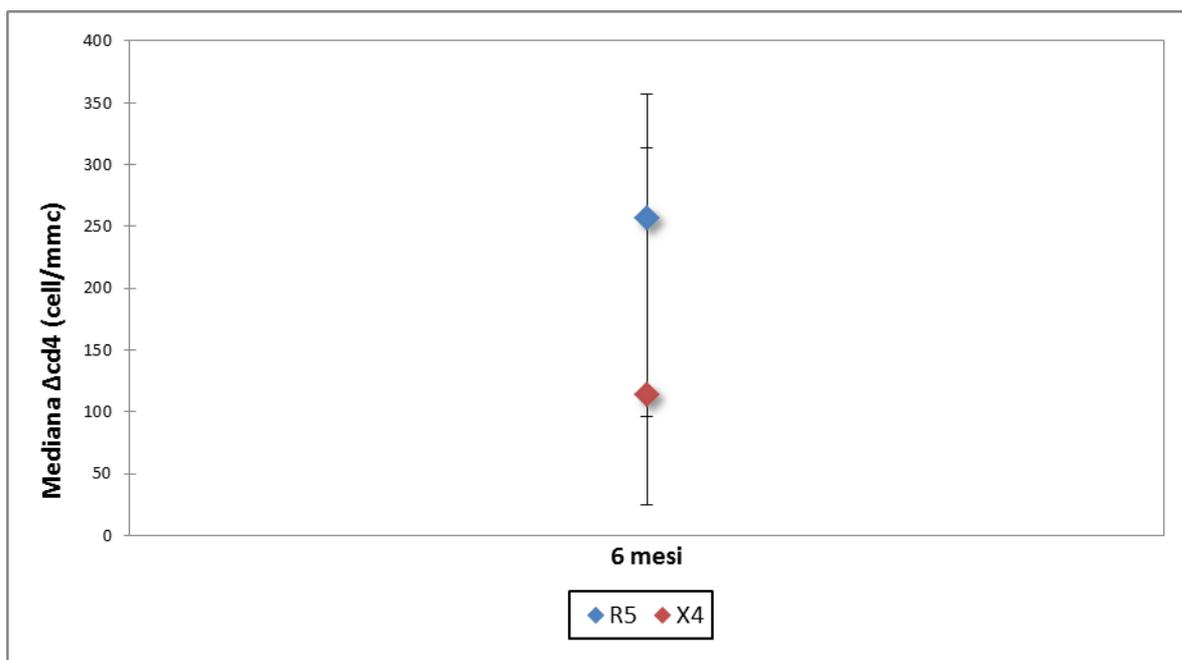


Figura 28. Confronto tra le mediane del recupero di cellule CD4+ da zero a sei mesi nei pazienti con infezione acuta-recente per diverso tropismo virale R5 o X4

$\Delta CD4$	R5	X4
6 mesi	256,500	114,000

Nella figura si riconferma il maggior recupero immunologico dei pazienti R5 rispetto agli X4 nei primi sei mesi.

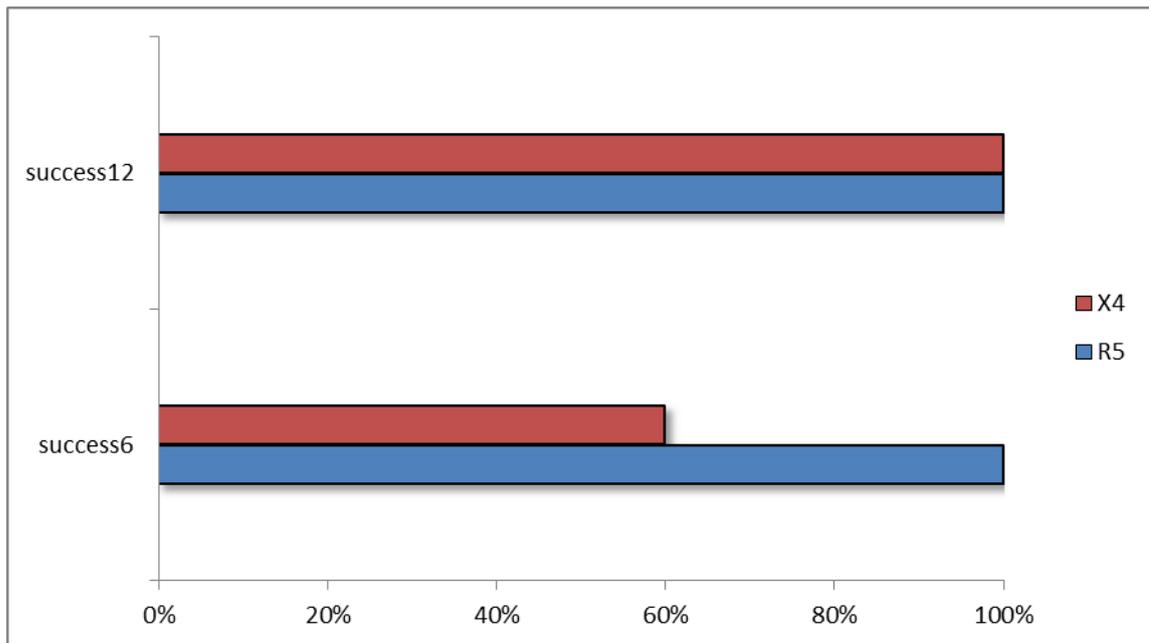


Figura 29. Successo virologico (HIV-RNA < 37 copie/mL) a sei e dodici mesi in pazienti AIDS presenters a diverso tropismo R5 o X4.

A sei mesi, a parità di livelli di viremia al baseline i pazienti AIDS presenter a tropismo R5 mostrano un successo virologico ai sei mesi nel 100% dei casi (soppressione di HIV-RNA < 37 copie/mL), diversamente dagli X4 (60%).

A dodici mesi invece, entrambi le coorti di pazienti AIDS presenter R5 e X4 raggiungono il successo virologico nel 100% dei casi.

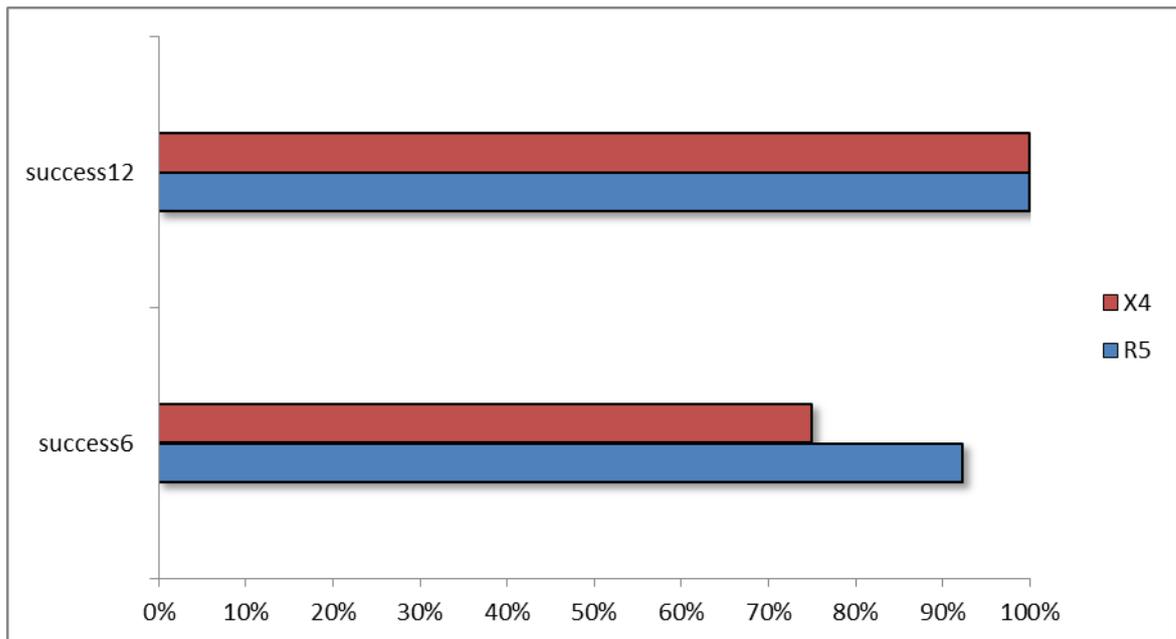


Figura 30. Successo virologico (HIV-RNA < 37 copie/mL) a sei e dodici mesi in pazienti AIDS presenters a diverso tropismo R5 o X4.

A sei mesi, nella popolazione con infezione acuta/recente si rileva che i pazienti R5 raggiungono la soppressione virologica a sei mesi nel 92% dei casi, contro il 75% degli X4.

A dodici mesi, nella popolazione si rileva un raggiungimento della soppressione virologica nel 100% dei casi.

All'interno della popolazione R5, i pazienti che ricevono maraviroc seguono un più lento ma costante recupero nella conta dei linfociti T CD4+, fino a raggiungere ai 12 mesi livelli più elevati rispetto ai pazienti in terapia con altre classi di inibitori; la soppressione dell'HIV-RNA sotto le 37 copie/mL ai sei mesi si realizza nel 100% dei casi con maraviroc rispetto al 56% con altri antiretrovirali.

B Cons	time point	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	FPR			
MEED	t_0	G	T	.	.	A	S	82,90%	R5	
PASI	t_0	A	A	N	.	.	K	.	Y	.	.	.	17,10%	R5	
PASI	t_6	A	A	N	.	.	K	.	Y	.	.	.	17,10%	X4	
TOML	t_0	P	M	.	.	.	G	.	L	.	V	.	.	A	.	.	N	77,60%	R5	
TOML	t_6	P	M	.	.	.	G	.	L	.	V	.	.	A	.	.	N	77,60%	R5	
TOML	t_12	P	M	.	.	.	G	.	L	.	A	I	.	.	A	.	.	N	95,80%	R5	
TUPA	t_0	A	.	.	.	D	52,10%	R5
TUPA	t_6	A	.	.	.	D	52,10%	R5
TUPA	t_12	A	.	.	.	D	52,10%	R5

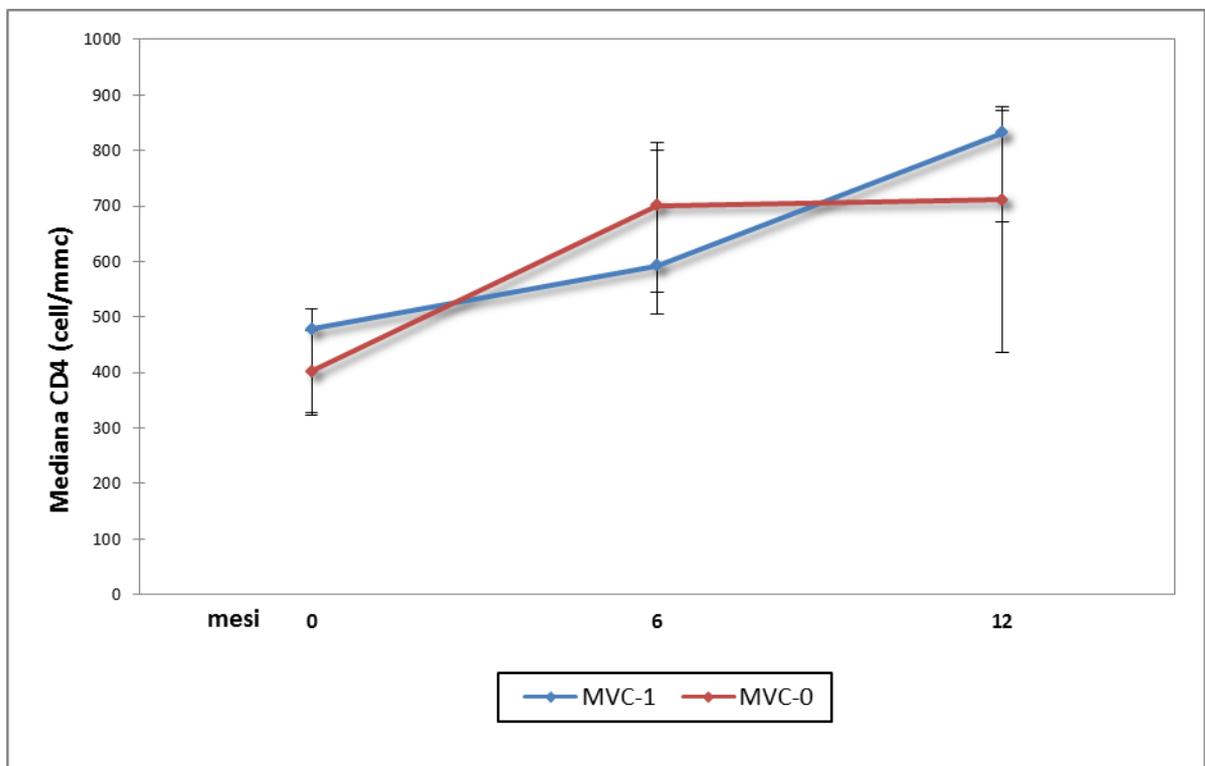


Figura 31. Confronto del recupero di cellule T CD4 tra pazienti R5 con infezione acuta/recente in terapia con o senza maraviroc.

Mediana T CD4+	MVC-1	MVC-0
mese 0	478,500	402,000
mese 6	593,000	700,500
mese 12	832,000	711,000

IC95 0-MVC1 (322;514); IC95 6-MVC1(544;801) – IC95 12-MVC1 (672;872);

IC95 0-MVC0 (327;476); IC95 6-MVC0(505;815) – IC95 12-MVC0 (437;879);

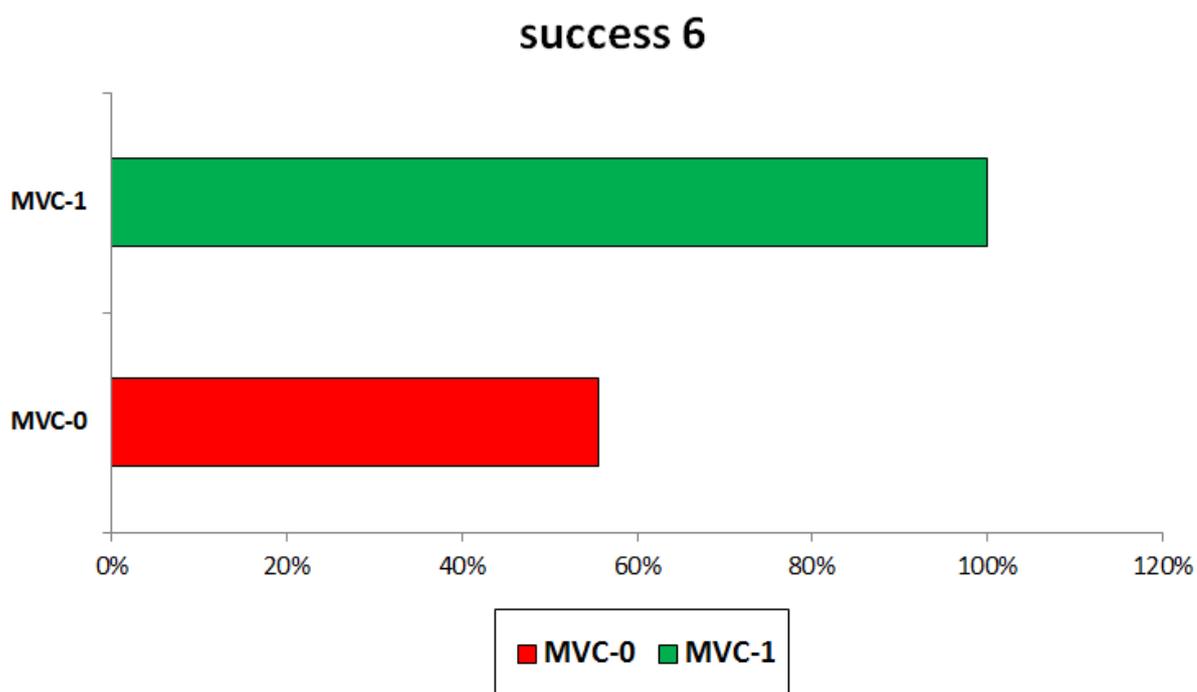


Figura 32 Confronto del successo virologico (HIV-RNA < 37 copie/mL) a sei mesi tra pazienti R5 in terapia con e senza maraviroc.

Dai risultati preliminari sull'analisi delle sequenze dei pazienti in terapia con maraviroc non c'è evidenza di mutazioni correlate con la resistenza al farmaco; in un singolo caso avviene

una sostituzione aminoacidica, che tuttavia sposta ulteriormente il valore di FPR verso un tropismo R5.

4.6 ANALISI MULTIVARIATA DEL NUMERO DI CELLULE T CD4+ NEI PRIMI SEI MESI NEI PAZIENTI SIA CON INFEZIONE ACUTA/RECENTE SIA AIDS PRESENTERS

L'analisi dei determinanti del successo immunologico, inteso come numero assoluto di cellule CD4+ recuperate nel corso della terapia dal baseline ai 6 mesi in entrambi i bracci presi in considerazione, ha fornito una misura di quanto ciascuna variabile presa in considerazione (livelli di cellule CD4+ al baseline, tropismo R5 o X4) è influenzata indipendentemente dall'effetto delle altre variabili.

Fonte	Valore	Deviazione standard	t	Pr > t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)
cd4_0	0,647	0,147	4,399	0,001	0,344	0,950
Tropismo-R5	0,154	0,147	1,047	0,305	-0,149	0,457
Tropismo-X4	0,000	0,000				

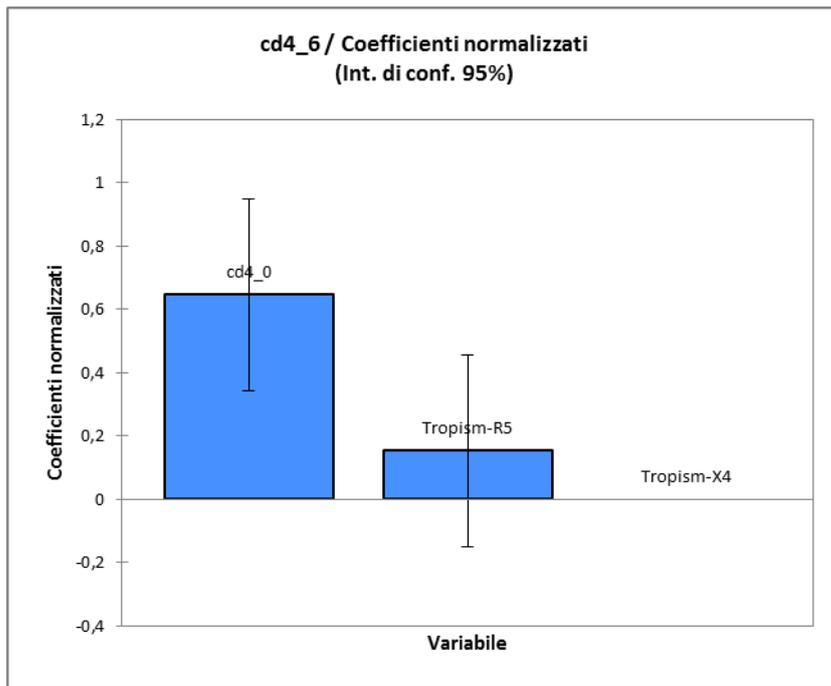


Figura 33. Analisi multivariata del numero di cellule T CD4+ nei primi sei mesi

I coefficienti associati a ciascuna variabile sono normalizzati sull'asse 0 in modo che possano essere confrontati sulla stessa scala.

Il coefficiente positivo associato alla variabile CD4_0 identifica una correlazione direttamente proporzionale tra il numero di cellule CD4+ al baseline ed il recupero immunologico nei primi 6 mesi, con un $p < 0,001$; alla variabile tropismo R5 è associato un coefficiente positivo, che comporta un'influenza diretta sul recupero di cellule CD4+, pur non supportata da sufficiente significatività statistica; alla variabile tropismo X4 è associato un coefficiente nullo, con conseguente assenza di un impatto dimostrabile sul recupero immunologico.

4.7 ANALISI MULTIVARIATA DEL NUMERO DI CELLULE T CD4+ NEI DODICI MESI NEI PAZIENTI SIA CON INFEZIONE ACUTA/RECENTE SIA AIDS PRESENTERS.

	Valore	Deviazione standard	t	Pr > t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)
cd4_0	0,610	0,222	2,750	0,017	0,131	1,089
Tropismo-R5	0,015	0,222	0,068	0,947	-0,464	0,494
Tropismo-X4	0,000	0,000				

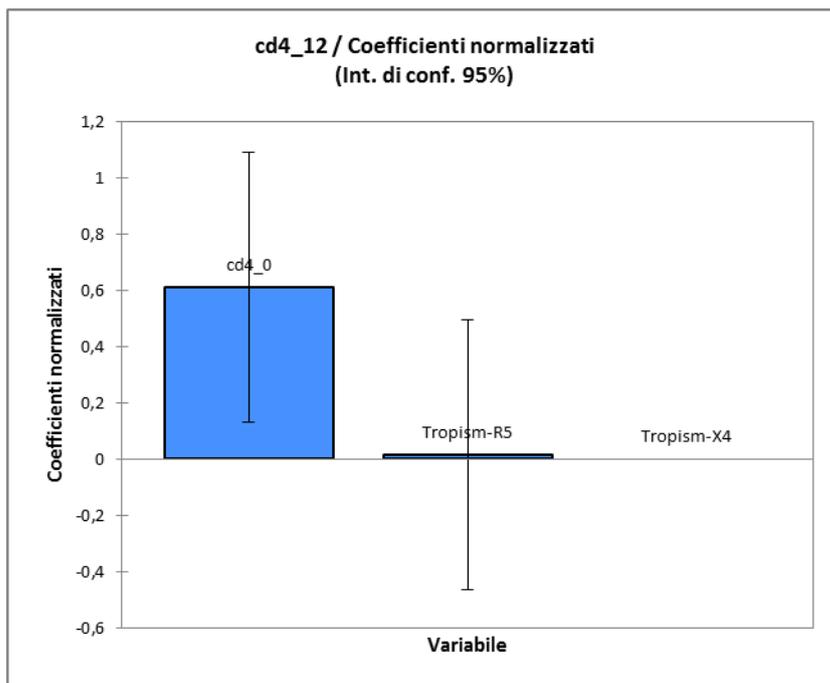


Figura 34. Analisi multivariata del numero di cellule T CD4+ nei dodici mesi

Fonte	Valore	Deviazione standard	t	Pr > t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)
cd4_0	-0,428	0,188	-2,276	0,032	-0,818	-0,039
Tropismo-R5	0,202	0,188	1,073	0,295	-0,187	0,591
Tropismo-X4	0,000	0,000				

I coefficienti associati a ciascuna variabile sono normalizzati sull'asse 0 in modo che possano essere confrontati sulla stessa scala.

Il coefficiente positivo associato alla variabile CD4_0 identifica, anche in questo caso, una correlazione direttamente proporzionale tra il numero di cellule CD4+ al baseline ed il recupero immunologico nei 12 mesi, con un $p < 0,017$; alla variabile tropismo R5 è associato un coefficiente positivo, che comporta un'influenza diretta sul recupero di cellule CD4+, pur non supportata da sufficiente significatività statistica; alla variabile tropismo X4 è associato un coefficiente nullo, con conseguente assenza di un impatto dimostrabile sul recupero immunologico.

4.8 ANALISI MULTIVARIATA DEL RECUPERO DI CELLULE T CD4+ NEI PRIMI SEI MESI NEI PAZIENTI SIA CON INFEZIONE ACUTA/RECENTE SIA AIDS PRESENTERS.

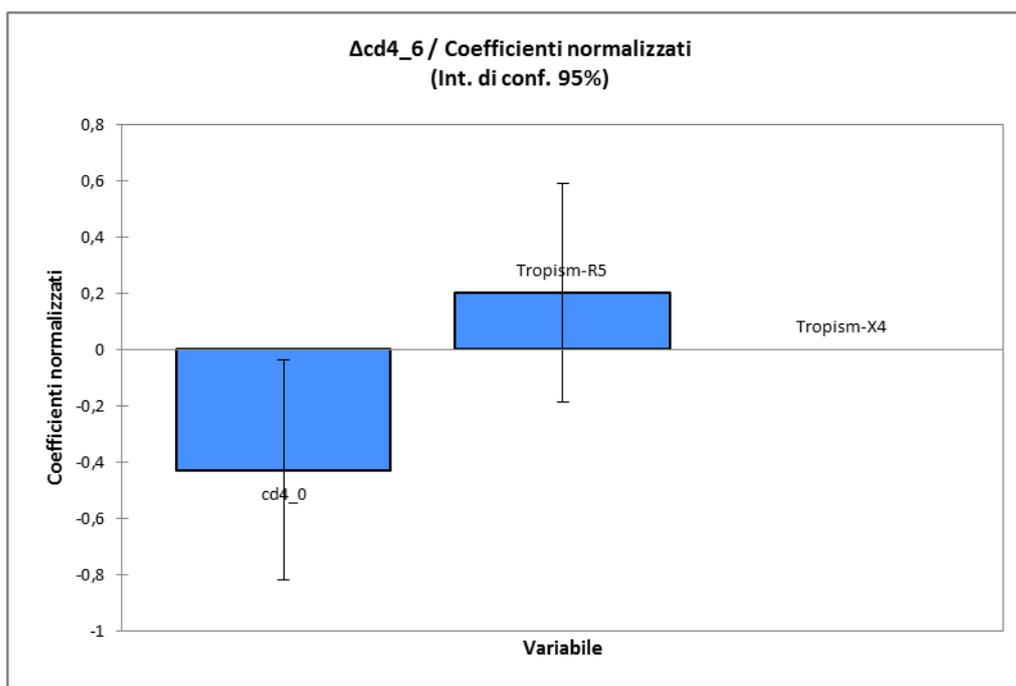


Figura 35. Analisi multivariata del recupero di cellule T CD4+ nei primi sei mesi

I coefficienti associati a ciascuna variabile sono normalizzati sull'asse 0 in modo che possano essere confrontati sulla stessa scala.

Il coefficiente negativo associato alla variabile CD4_0 identifica una correlazione inversa tra il numero di cellule CD4+ al baseline ed il recupero immunologico nei primi 6 mesi, con un $p < 0,032$; alla variabile tropismo R5 è associato un coefficiente positivo, che comporta un'influenza diretta sul recupero di cellule CD4+, pur non supportata da sufficiente significatività statistica; alla variabile tropismo X4 è associato un coefficiente nullo, con conseguente assenza di un impatto dimostrabile sul recupero immunologico.

4.9 ANALISI MULTIVARIATA DEL RECUPERO DI CELLULE T CD4+ NEI DODICI MESI NEI PAZIENTI SIA CON INFEZIONE ACUTA/RECENTE SIA AIDS PRESENTERS.

Fonte	Valore	Deviazione standard	t	Pr > t	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)
cd4_0	-0,500	0,259	-1,929	0,080	-1,070	0,070
Tropismo-R5	-0,098	0,259	-0,379	0,712	-0,669	0,472
Tropismo-X4	0,000	0,000				

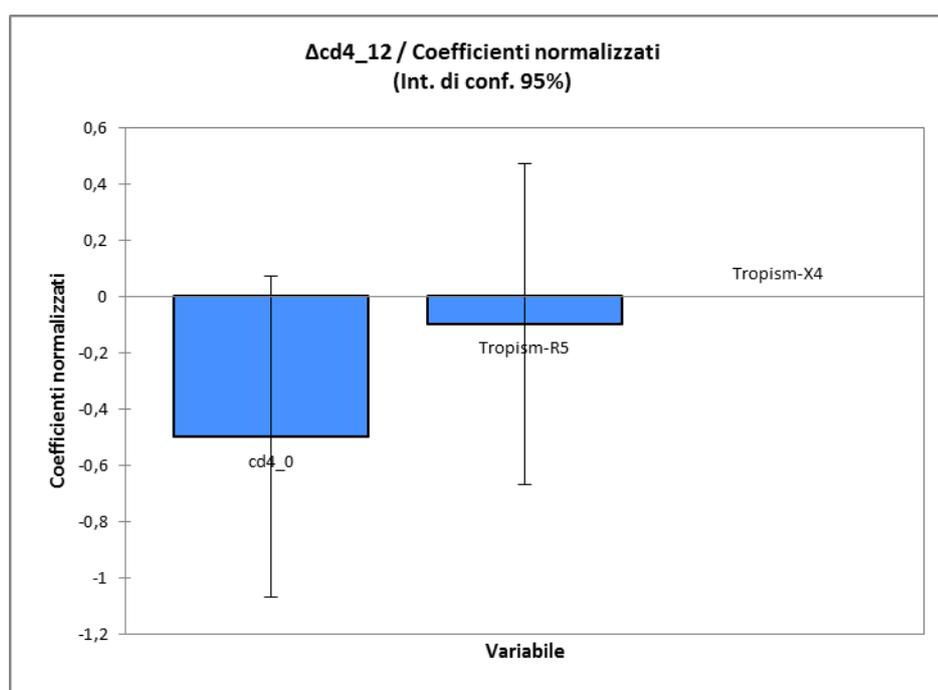


Figura 36. Analisi multivariata del recupero di cellule T CD4+ nei dodici mesi

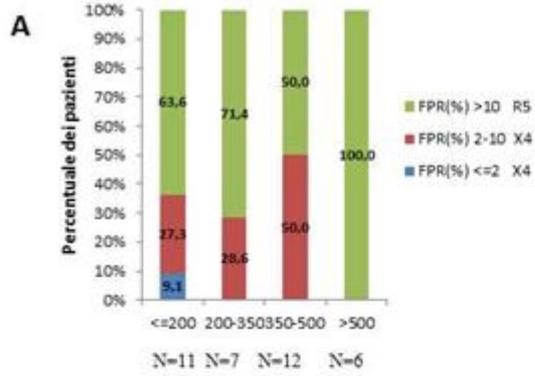
I coefficienti associati a ciascuna variabile sono normalizzati sull'asse 0 in modo che possano essere confrontati sulla stessa scala.

Il coefficiente negativo associato alla variabile CD4_0 identifica una correlazione inversa tra il numero di cellule CD4+ al baseline ed il recupero immunologico nei primi 12 mesi,

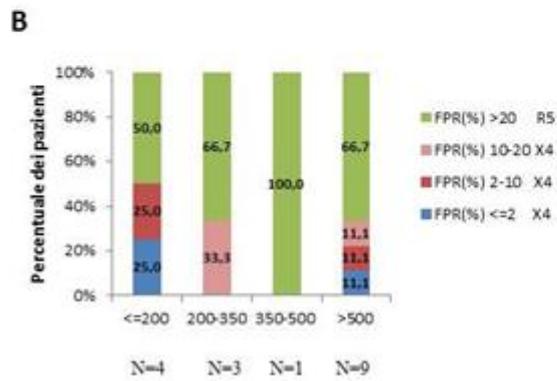
con un $p < 0,080$ (che però indica solo una tendenza), pur non supportata da sufficiente significatività statistica; alla variabile tropismo R5 è associato un coefficiente negativo, che comporta un'influenza inversa sul recupero di cellule CD4+, pur non supportata da sufficiente significatività statistica; alla variabile tropismo X4 è associato un coefficiente nullo, con conseguente assenza di un impatto dimostrabile sul recupero immunologico.

4.10 VALUTAZIONE DELLA RELAZIONE TRA LA PREDIZIONE DEL TROPISMO GENOTIPICO E I PARAMETRI IMMUNO-VIROLOGICI

Analizzando differenti strati di conta delle cellule CD4 (≤ 200 , 200-350, 350-500, > 500 cells/mm³), alcune differenze sono state osservate nella proporzione di pazienti con tropismo X4 con FPR $\leq 2\%$ al baseline (9,1% al ≤ 200 cells/mm³) rispetto al tempo t6 (25% al ≤ 200 cells/mm³ e 11,1% al > 500 cells/mm³), e rispetto al tempo t12, in cui non si osserva alcuna proporzione di pazienti con tropismo X4 con FPR $\leq 2\%$ come si osserva dalle figure 37 A,B,C rispettivamente.



ART-naive patients		
Tropism	FPR (%)	p value
R5	>10	0,447
X4	2-10	0,746
X4	<=2	0,203



ART-experienced patients		
Tropism	FPR (%)	p value
R5	>20	0,607
X4	10-20	0,890
X4	2-10	0,652
X4	<=2	0,652

C

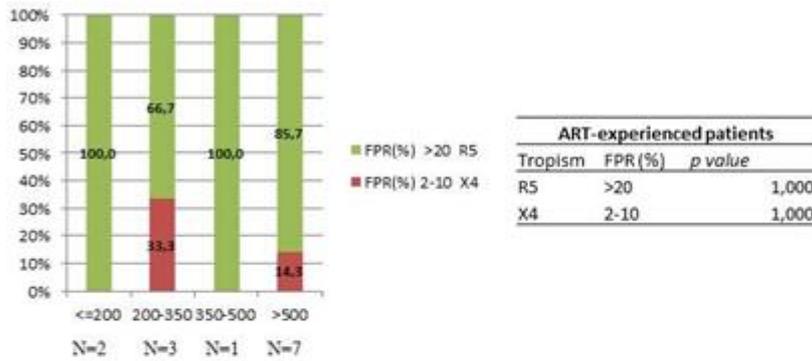


Figura 37. Proporzione di pazienti con tropismo R5 e X4 in funzione dei range di conta dei linfociti CD4.

Sono state riscontrate differenze nella proporzione di pazienti con tropismo X4 con FPR 2-10%, in accordo con differenti ranges di conta delle cellule CD4 (≤ 200 , 200-350, 350-500, >500 cells/mm³). Al baseline, la proporzione di pazienti è 27,3% vs 28,6% e 50% vs 0%. Al t6 la proporzione di pazienti è pari al 25% nel range ≤ 200 cells/mm³, e 11,1% nel range >500 cells/mm³. Al t12, invece è 33,3% tra 200-350 cells/mm³, 14,3% nel range >500 /mm³.

La proporzione di FPR tra 10-20 è stata presa in considerazione nel t6, in quanto solo in quel caso erano presenti pazienti X4 con tale valore di FPR. Si osserva un valore di 33,3% tra 200-350 cells/mm³ e 11,1% nel range >500 cells/mm³.

La proporzione di FPR >20 è stata presa in considerazione solo al t6 ed al t12 in quanto solo in questo caso è stata effettuata l'estrazione di DNA da sangue e/o PBMC.

Per cui, al t6 la proporzione di pazienti con tropismo R5 >20 è 50% vs 66,7% e 100% vs 66,7%. Al t12 invece la proporzione è 100% vs 66,7 e 100% vs 85,7%.

4.11 RISCHIO ASSOCIATO ALLO STADIO AVANZATO DELLA MALATTIA IN ACCORDO CON IL TROPISMO GENOTIPICO.

Nei pazienti in stadio di AIDS (numero di pazienti=16) è stato valutato il rischio di avere un numero di CD4 ≤ 200 cells/mm³, in funzione del valore di FPR, ed in particolare valutando due situazioni: FPR 2-10 vs. FPR >10 e FPR ≤ 10 vs. FPR >10. Come si osserva dalla figura 38, un FPR <10 ed un numero di cellule CD4 ≤ 200 cells/mm³ sono associati ad uno stadio avanzato della malattia, anche se non supportato da un'analisi statistica significativa.

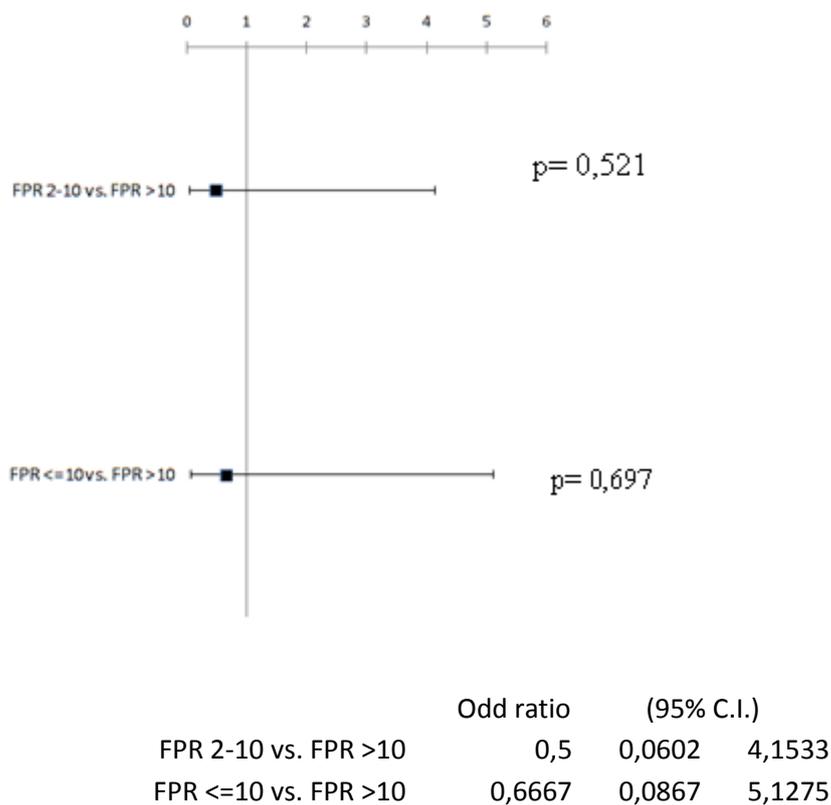


Figura 38. Rischio associato allo stadio avanzato della malattia in accordo con il tropismo genotipico.

I forest plots rappresentano gli odds ratio (con un intervallo di confidenza del 95%) in relazione alla conta delle cellule CD4 ≤ 200 cells/mm³ confrontando con differenti range di FPR.

5. DISCUSSIONE

Infezione acuta ed AIDS sono le fasi più estreme della storia naturale dell'infezione da HIV e dell'evoluzione del virus; difatti, esse rappresentano anche i momenti di massima esplosione della viremia plasmatica, prima che il sistema immune riesca a montare una risposta neutralizzante in grado di contenere l'infezione e dopo la fase di latenza clinica, nel momento in cui le difese immunitarie ormai deplete non riescono più a far fronte alla replicazione virale.

E' documentato in letteratura che a partire dall'infezione acuta, in cui predominano varianti del virus R5-tropiche che utilizzano il corecettore CCR5, durante la progressione della malattia si assiste fino nel 50-70% dei casi ad un cambiamento verso varianti X4 o DM in grado di legare il corecettore CXCR4; la presenza di queste varianti è stata correlata con un più rapido declino dei linfociti T CD4+ e ad una più rapida progressione alla condizione di AIDS conclamato e a morte.

L'analisi delle sequenze ottenute dall'amplificazione della regione V3 di gp120 e la correlazione con l'andamento del profilo immuno-virologico dei pazienti appartenenti al nostro studio ha permesso di trarre diverse conclusioni nel confronto tra le due diverse fasi della malattia.

L'evoluzione della regione V3 nell'infezione acuta si colloca in un contesto di elevatissima pressione selettiva da parte dell'immunità umorale, che coinvolge l'intero gene *env*, e sotto questa spinta essa muta per una grande estensione e spesso in modo afinalistico rispetto al tropismo, considerando l'impatto molto minore che le mutazioni vanno ad esercitare sulla variazione della carica della regione, il fattore che influisce effettivamente sull'affinità del virus per l'uno o l'altro dei corecettori.

Diversamente, si può osservare come le quasispecie virali presenti in fase avanzata, che rappresentano la popolazione con la maggiore fitness selezionata nel corso degli anni, tendano a replicare con maggiore efficienza, mutando in modo molto intenso su posizioni più localizzate (prevalentemente nella parte centrale, corrispondente alla corona dell'ansa), presumibilmente quelle che possono conferire al virus un vantaggio replicativo, specialmente quando non sia stata ancora introdotta la terapia.

Come atteso, la proporzione iniziale di virus X4-tropici è risultata molto importante nello stadio di AIDS (44% del totale) rispetto all'infezione acuta o recente, dove tuttavia questa popolazione è presente per il 25% del totale, elemento che testimonia la possibilità di trasmissione, seppur meno frequente, di queste varianti.

Il metodo del sequenziamento di popolazione da noi utilizzato permette una determinazione qualitativa del tropismo virale e ricostruisce l'evoluzione di V3 a livello della sequenza prevalente in ciascun individuo, con il limite di non rilevare eventuali varianti minoritarie non-R5. Queste varianti minoritarie possono venire selezionate, in special modo dalla terapia con antagonisti del corecettore CCR5, ed emergere successivamente, oppure varianti a diverso tropismo potrebbero evolvere dalle preesistenti tramite varie vie di mutazione.

Eseguendo un'analisi più approfondita mediante la metodica del sequenziamento ad alta processività o Ultra-Deep Pyrosequencing (UDPS), in grado di sequenziare simultaneamente migliaia di quasispecie virali, è stato possibile ottenere una determinazione quantitativa approfondita delle varianti presenti nell'organismo di ciascun soggetto infettato, ricostruendo le dinamiche dell'evoluzione del tropismo di HIV-1 all'interno dell'ospite in corso di terapia, dall'infezione acuta allo stadio di AIDS conclamato.

Andando a considerare le caratteristiche filogenetiche dei nostri pazienti in funzione del sottotipo si evince che l'89 % dei nostri pazienti presenta sottotipo B, il 2% è una URF non identificata, il 3% è un sottotipo CRF01_AE, il 3% è un sottotipo G ed infine il 3% è un sottotipo CRF 29_BF. La distribuzione nel mondo di distinti sottotipi di HIV-1 ha un impatto importante sull'epidemiologia, la patogenesi, la diagnosi, il trattamento e la prevenzione dell'infezione. La relazione tra sottotipo e decorso della malattia rimane inoltre in larga parte da chiarire.

Le mutazioni che insorgono nei sottotipi B sono state tutte riscontrate anche nei ceppi non-B. Al contrario, alcune nuove mutazioni sono insorte nei ceppi non-B. In alcuni casi, come ad esempio nel sottotipo C, si è potuto riscontrare una più rapida comparsa di alcune mutazioni associate a resistenza. Con l'aumento di tali ceppi nei paesi industrializzati diventa sempre più necessario lo studio della correlazione tra variabilità genetica e resistenza, e dal punto di vista clinico, la valutazione di tutte le mutazioni conosciute in caso di fallimento terapeutico.

L'obiettivo finale per controllare la pandemia da HIV-1 è la formulazione di un vaccino preventivo che sia sicuro, semplice e altamente efficace. La rapida evoluzione e la generazione di *escape mutants* dai ceppi di HIV-1 sono un enorme ostacolo, ma non di meno lo è la variabilità genetica e quindi antigenica di HIV-1.

All'interno delle due distinte coorti si è quindi proceduto all'analisi della correlazione tra i parametri riguardanti l'andamento del profilo immuno-virologico rispetto al tropismo virale al baseline.

La ricostituzione del sistema immune, valutata come recupero assoluto di cellule T CD4+ dal baseline ai sei mesi, mostra in entrambe le coorti un andamento più favorevole nei pazienti R5 rispetto agli X4, più evidente nell'infezione acuta (R5: 256,5 cell/ μ L; X4: 114 cell/ μ L) rispetto alla fase avanzata di AIDS (R5: 81 cell/ μ L; X4: 71 cell/ μ L).

Dai dati provenienti dal nostro campione sembra dunque riconfermarsi sia negli stadi più avanzati che nell'infezione acuta l'influenza negativa descritta in letteratura dei ceppi X4-tropici sul recupero immunologico.

Per quanto riguarda la risposta virologica alla terapia, abbiamo invece rilevato risultati discordanti nelle due coorti, con una soppressione della carica virale a sei mesi nel 100% dei pazienti R5 e nel 60% degli X4 all'interno del gruppo degli AIDS presenters, contro il 92,3% degli R5 e il 75% negli X4 nel gruppo delle infezioni acute e recenti. Questo secondo risultato subisce tuttavia l'influenza del cut-off estremamente rigoroso che definisce la soppressione della carica virale, con il limite di detezione di HIV-RNA fissato a 37 cp/mL, e del diverso livello di HIV-RNA al baseline nella coorte che comprende i pazienti con infezione acuta/recente, dove i pazienti R5 partono da 1 Log di RNA più in alto degli X4, raggiungendo comunque livelli molto prossimi alla completa soppressione. Il livello di HIV-RNA di partenza nei pazienti AIDS presenters risulta invece pari nei due gruppi di pazienti a diverso tropismo. Emerge in ogni caso la necessità di seguire nel tempo le dinamiche della viremia plasmatica per attuare le opportune variazioni terapeutiche.

L'osservazione nel tempo dell'evoluzione della regione V3 ha documentato il cambiamento del tropismo virale in entrambi i momenti dell'infezione, acuta/recente e in stadio avanzato. Ha mostrato inoltre la possibilità che questo cambiamento avvenga sia nella direzione da ceppi R5 o M-tropici a X4 o T-tropici, sia nella direzione inversa, e che le due varianti siano rilevabili ad intermittenza nello stesso soggetto. Nel campione e nel periodo temporale analizzato, i pazienti "switcher" non hanno tuttavia mostrato un diverso andamento immuno-virologico rispetto ai "non-switcher" della coorte di appartenenza. Per valutare le eventuali ripercussioni dello switch sarà necessario proseguire l'osservazione dei pazienti a lungo termine determinandone le varianti che assumono la prevalenza.

Degno di nota è il fatto che l'antagonista selettivo di CCR5 maraviroc non ha determinato l'insorgenza di mutazioni correlate a resistenza o a cambiamento del tropismo nel sottogruppo di pazienti R5 cui è stato somministrato. Inoltre, questi pazienti hanno dimostrato una completa soppressione virologica già a 6 mesi e un più lento ma costante recupero di cellule T CD4+, fino

a raggiungere ai 12 mesi valori maggiori rispetto a pazienti R5 in terapia con altre classi di inibitori di HIV-1.

Anche in questo caso il livello insufficiente di significatività statistica rende necessarie la prosecuzione dello studio nel tempo e l'espansione del campione per confermare questa tendenza; sarà inoltre da determinare se l'andamento immunologico riscontrato venga mantenuto utilizzando maraviroc nell'infezione acuta per una prima fase di induzione come quarto farmaco associato alla HAART, fino a sei mesi dopo la completa soppressione virologica, seguita da mantenimento con terapia a tre farmaci.

L'analisi multivariata condotta per valutare i determinanti indipendenti della ricostituzione immunologica ha evidenziato all'interno del gruppo delle infezioni acute e recenti la correlazione con due variabili di considerevole interesse.

In primo luogo si conferma una correlazione positiva tra il tropismo R5 e il numero di cellule CD4 in entrambi i bracci presi in considerazione, sia a 6 mesi che a distanza di 12 mesi dalla terapia.

In secondo luogo l'analisi dimostra come, indipendentemente dal tropismo virale, il numero di cellule CD4+ guadagnate in corso di terapia nei primi sei mesi goda di una correlazione inversa con i livelli delle stesse cellule al baseline, anche se non correlato da significatività statistica.

In altre parole, più bassi sono i livelli iniziali di linfociti T CD4+, maggiore è l'espansione del pool di linfociti CD4+ che si determina con l'inizio della terapia nelle fasi precoci dell'infezione da HIV-1. Resta da definire se l'espansione *de novo* dei linfociti T CD4+ sia a carico delle cellule naive, il che conferirebbe un vantaggio qualitativamente maggiore del recupero immunologico.

La stessa correlazione non è presente nei pazienti in fase avanzata dove la deplezione del sistema immune risulta molto meno reversibile e il recupero dei linfociti CD4 è minore.

Questa osservazione depone a favore del trattamento tempestivo dell'infezione acuta, in quanto fornisce evidenze di un aumentato recupero e di una preservazione del pool delle cellule T CD4+ agendo in corrispondenza del picco iniziale di viremia.

Abbiamo ulteriormente valutato l'associazione tra il valore di FPR (percentuale di falsi positivi) ed il numero di cellule CD4. Quello che si evince da questa analisi è che una più bassa

percentuale di FPR è associata ad una maggiore deplezione di cellule CD4, confermando quindi le ipotesi effettuate nello studio svolto da Santoro M.M. et al. [254]

Un'ultima valutazione che è stata effettuata è stata quella di considerare il rischio associato allo stadio avanzato della malattia (nel braccio degli AIDS presenters, con numero di $CD4 \leq 200$ cells/mm³) in accordo con il tropismo genotipico.

Come si evince dalla figura 38 un FPR ≤ 10 è associato ad un più alto rischio associato allo stadio di avanzamento della malattia rispetto ad un FPR > 10 , questo conferma l'associazione tra bassi valori di FPR e stadio più avanzato della malattia.

In conclusione, questo studio apre delle prospettive su più fronti.

La prima prospettiva è relativa allo sviluppo temporale e all'ampliamento del campione dello studio stesso, con una migliore definizione dell'impatto dell'evoluzione del tropismo virale sulle dinamiche immuno-virologiche nelle due diverse fasi dell'infezione da HIV.

Una seconda prospettiva è rappresentata dalla determinazione a lungo termine dell'outcome del trattamento dell'infezione acuta nei pazienti con diverso tropismo e, tra coloro che albergano ceppi R5 tropici, la risposta a maraviroc nel tempo sorvegliando l'eventuale insorgenza di cambiamenti verso un tropismo di tipo X4 o di resistenze che possano compromettere il successo della terapia.

La terza prospettiva, relativa all'approfondimento dell'analisi genotipica del tropismo virale nel tempo, è attualmente in corso di realizzazione in collaborazione con un altro centro – *Centre for Excellence in HIV/AIDS, University of British Columbia, Vancouver* – sui medesimi campioni dei pazienti arruolati nel nostro studio.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Hymes, KB, Greene, JB, Marcus, A et al. Kaposi's sarcoma in homosexual men: A report of eight cases, *Lancet* 1981; 2: 598-600.
2. MMWR weekly 1981. Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis Pneumonia among Homosexual Men- New York City and California; 4,30; 305-308.
3. MMWR weekly 1981. Follow-up on Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis Pneumonia; 30; 409-410.
4. MMWR weekly 1981. Pneumocystis Pneumonia- Los Angeles; 5, 30; 1-3.
5. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England Journal of Medicine* 1981; 305:1425-1431.
6. Goedert JJ, Neuland CY, Wallen WC. Amyl Nitrite may alter T lymphocytes in homosexual men. *Lancet* 1982; 1: 412-416.
7. MMWR weekly 1982. A cluster of Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis carinii Pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California; 18, 31; 305-307.
8. Marx JL. New Disease Baffles Medical Community, *Science* 1982; 217: 618-621.
9. MMWR 1982. Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)- United States; 24, 31; 507-508, 513-514.
10. Barre-Sinoussi F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868-871.
11. Levy JA, et al. Isolation of lymphocytotropic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984; 223: 840-842.
12. Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L. et al. Human Immunodeficiency viruses. *Science* 1986; 232: 697.
13. Gonda MA, Wong-Staal F, Gallo RC and Chou MJ. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* 1985; 227:173-177.
14. Gonda MA, Braun MJ, Clements JE et al. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentivirus. *Science* 1985; 83: 4007-4011.
15. Myers G, and Pavlakis GN. Evolutionary potential of complex retroviruses. In: Levy J.A., ed. *The retroviridae*. New York: Plenum. Press 1992; 51-105
16. Jones WK, and Curran JW. Epidemiology of HIV infection in industrialized countries. In: Broder S, Merigan TC, Bolognesi D., eds . *textbook of AIDS medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins 1994, 91-108.

17. Quinn TC. Population migration and the spread of types 1 and 2 human immunodeficiency viruses. *Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2407-2414
18. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes* *Nature* 1999; 397: 436-441.
19. Hahn BH, Shaw GM, DeCock KM, Sharp PM. AIDS as a Zoonosis. *Science* 2000; 287: 607-614.
20. Bailes E, Gao F, Bibollet-Ruche F et al. Hybrid Origin of SIV in Chimpanzees. *Science* 2003; 300: 1713.
21. Van Heuverswyn F. et al. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* 2006; 444: 166.
22. Worobey M, Santiago ML, Keele BF, Ndjango JB, Joy JB, Labama BL, Dheda A, Rambaut A, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH. Origin of AIDS: contaminated polio vaccine theory refuted. *Nature*. 2004 22; 428: 820.
23. Blancou P, Vartanian JP, Christopherson C, Chenciner N, Basilico C, Kwok S, Wain-Hobson S. Polio vaccine samples not linked to AIDS. *Nature*. 2001 26; 410: 1045-6.
24. Korber B, Kuiken C, Foley B et al. Human Retroviruses and AIDS 1998: A compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Los Alamos National Laboratory Los Alamos, New Mexico.
25. Perrin L, Kaiser L, and Yerly S. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *The Lancet* 2003; 3: 22-27.
26. Plantier JC., Leoz M. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine* 2009: 871-872.
27. Moroni M, Esposito R, De Lalla F, Malattie Infettive. Masson Editore, Milano, 2003.
28. Haseltine W A. Molecular Biology of the Human Immunodeficiency virus Type 1. *The FASEB Journal*, 1991; 5: 2349-2360.
29. Hunter E. Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. *Sem Virol* 1994; 5: 71-83.
30. Goff SP. Genetics of retroviral integration. *Annual review of genetics* 1992; 26: 527-544.
31. Gallay P, Swingler S, Aiken C, Trono D. HIV infection of non-dividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a keyregulator. *Cell* 1995; 80: 379-388.
32. Henderson LE, Bowers MA, Sowder RC et al. Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processing and complete amino sequences. *Journal of Virology* 1992; 66: 856-1865.

33. Yu XF, Yuan X, Matsuda Z, Lee th, Essex M. The matrix protein of human immunodeficiency type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into matura virions. *Journal of Virology* 1982; 66: 4966-4971.
34. Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature*, 1993; 365: 666-669.
35. Heinzinger NK, Burkrinsky MI, Haggerty SA et al. The vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in non-dividing cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91: 7311-7315.
36. Luban L, Bossolt KL, Franke EK, KalpanaGV, Goff SP. Human immunodeficiency virus type 1 gag protein binds to the cyclophilins A and B. *Cell*, 1993; 73: 1067-1078.
37. Dorfman T, Bukovsky A, Ohagaen A, Hoglund S, Gottlinger HG. Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 1994; 68: 8180-8187.
38. Von Poblitzki A, Wagner R, Niedrig M, Wanner G, Wolf H, Modrow S. Identification of a region in the Pr55gag-polyprotein essential for HIV particle formation. *Virology* 1993; 193: 981-985.
39. Karpel RL, Henderson L, Oroszian S. Interactions of retroviral structural proteins with ingle-stranded nucleic acids. *The Journal of biological chemistry* 1987; 262: 4961-4967.
40. Wills NM, Craven RC. Form, function and use of retroviral gag proteins. *AIDS* 1991; 5: 639-654.
41. Kohl NE, Emini EA, Schleif WA et al. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85: 4686-4690.
42. Loeb DD, Swanstrom R, Everitt L, Manchester M, Stamper SE, Hutchinson CA. Complete mutagenesis of the HIV-1 protease. *Nature* 1989; 68: 4857-4861.
43. Manchester M, Everitt L, Loeb DD, Hutchinson CA, Swanstrom R. Identification of temperature-sensitive mutants of human immunodeficiency virus type 1 protease through saturation mutagenesis. Amino acid requirements for temperature sensitivity. *The Journal of biological chemistry* 1994; 269: 7689-7695.
44. Kempf DJ. Design of symmetry-based, peptidomimetic inhibitors of human immunodeficiency virus protease. *Retroviral proteases*. San Diego: Academy Press 1994; 334-354.
45. Vacca JP. Design of tight-binding human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *San Diego: Academy Press* 1994; 311-334.

46. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* 1970; 226: 1209-1211.
47. Mizutani S, Temin HM. RNA-dependent DNA Polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970; 226: 1211-1213.
48. Skalka AM, Goff SP. Reverse transcriptase. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1993; p. 492.
49. Prasad VR, Goff SP. Linker insertion mutagenesis of human immunodeficiency virus reverse transcriptase expressed in bacteria: definition of the minimal polymerase domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86: 3104-3108.
50. Le Grice SFJ, Naas T, Wohlgensinger B, Schatz O. Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *THE EMBO JOURNAL* 1991; 10: 3905-3911.
51. Hostomsky Z, Hudson GO, Woomaw EW, Nides BR. Reconstitution in vitro of RNase H activity by using purified N-terminal and C-terminal domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 99:1148-1152.
52. Kohlstaed LA, Wang JM, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, 1992; 256: 1783-1790.
53. Barat C, Le Grice SFJ, Darlix JL. Interaction of HIV-1 reverse transcriptase with a synthetic form of its replication primer tRNA^{Iys3}. *Nucleic acids research*, 1991; 19: 751-757.
54. Barat C, Lullien V, Barreè-Sinoussi F, Le Grice SFJ, Darlix JL. HIV-1 reverse transcriptase specifically interacts with the anticodon domain of its cognate primer tRNA. *EMBO Journal*, 1989; 8: 3279-3285.
55. Goff SP. Genetics of retroviral integration. *Annual review of genetics* 1992; 26: 527-544.
56. La Femina RL, Callaghan PL, Cordingley MG. Substrate specificity of recombinant human immunodeficiency virus integrase protein. *Journal of Virology*, 1991; 65: 5624-5630.
57. Stevenson M, Haggerty S, Lamonica CA, Meier CM, Wasiak AJ. Integration is not necessary for expression of human immunodeficiency virus type 1 protein products. *Journal of Virology* 1990; 64: 2421-2425.
58. Wiskerchen M, Muesing MA. Human immunodeficiency virus type 1 integrase: effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from unintegrated viral DNA templates and sustain viral propagation in primary cells. *Journal of Virology*, 1995; 69: 376-386.
59. Vincent KA, Ellison V, Chow SA, Brown PO. Characterization of human immunodeficiency

- virus type 1 integrase expressed in *Escherichia Coli* and analysis of variants with amino-terminal mutations. *Virology*, 1993; 193:981-985.
60. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annual review of immunology*, 1999; 17: 657-700.
 61. Weiss CD, Levy JA, White JM. Oligomeric structure of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *Journal of Virology* 1990;64: 5674-5677.
 62. Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ et al. V3: HIV's switch hitter. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2005; 2: 171-189.
 63. Ho DD, Rota TR, Schooley et al. Isolation of HTLV-III from cerebrospinal fluid and neural tissues of patients with neurologic syndromes related to the acquired immunodeficiency syndrome. *New England Journal of Medicine* 1985; 313: 1493-1497.
 64. Schüpbach J, Tomasik Z, Nadal D, Ledergerber B, Flepp M, Opravil M, Böni J. Use of HIV-1 p24 as a sensitive, precise and inexpensive marker for infection, disease progression and treatment failure. *Int J Antimicrob Agents*. 2000 Dec;16(4):441-5.
 65. Maddon PJ, Dalgleish AG, Mc Douglas JS et al. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 1986; 47: 333-348.
 66. Cocchi F, De Vico AL, Garzino-Demo A et al. Identification of RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β as the major HIV-1 suppressive factors produced by CD8 T cells. *Science* 1995; 270: 1811-1815.
 67. Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annual review of immunology* 1994; 11: 593-633.
 68. Baggiolini M, De Wald B, Moser B et al. Human chemokines: an update. *Annual review of immunology* 1997; 15: 675-705.
 69. Murphy PM. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine & growth factor reviews* 1996; 7: 47-46.
 70. Ben-Baruch A, Micheil DF, Oppenheim JJ. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *The Journal of biological chemistry* 1995; 270: 11703-11706
 71. Taub DD. Chemokine-leukocyte interactions. *Cytokine & growth factor reviews* 1996; 7: 355-376.
 72. Oppenheim JJ, Wang JM, Chertov O et al. The role of chemokine in transplantation virology. In: Tinley NL, Strom TB, Paul L C, et al. *Cellular and molecular aspects*. Philadelphia: Lippincott-raven Publishers, 1996; p. 187-200.
 73. Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet*. 2001 Nov;26(1-6):13-33.

74. Sodroski J, Goh W C, Rosen C, Tartar A, Portetelle D, Burney A, and Haseltine W A. Replication and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with sor gene deletions. *Science*, 1986; 231: 1549-1553.
75. Lifson J D, Feinberg M R, Reyes G R, Rabin L, Basiripour B, Chakrabarti S, Moss B, Wong-Staal F, Steimer K S, and Engleman E G. Induction of CD4-dependent cell fusion by HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature*, 1986;323: 725-728.
76. Varmus H E, and Swanstrom R. Replication of retroviruses In *RNA Tumor Viruses*. (Weiss R, Teich N, Varmus H, and Coffin J, eds). Cold Spring 1. Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; pp. 75-134.
77. Panganiban A, and Fiore D. Ordered interstrand and intrastrand DNA transfer during reverse transcription. *Science*, 1988; 241: 1064-1069.
78. Rosen C A, Sodroski J G, and Haseltine W A. The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLVIII/LAV) long terminal repeat. *Cell*, 1985; 41: 813-823.
79. Lu Y, Touzjian N, Stenzel M, Dorfman T, Sodroski J G, and Haseltine W A. Identification of cis-acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 1990;64: 5226-5229.
80. Laspia M F, Rice A P, and Mathews M B. Synergy between HIV-1 Tat and adenovirus E1A is principally due to stabilization of transcriptional elongation. *Genes & Development*., 1990; 4: 2397-2408
81. Marciniak R A, Cainan B J, Frankel A D, and Sharp P A. HIV tat protein trans-activates transcription in vitro. *Cell*, 1990; 63: 791-802.
82. Peterlin B M, Luciw P A, Barr P J, and Walker M D. Elevated levels of mRNA can account for the transactivation of human immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986; 83: 9734-9738.
83. Burnett J C et al. Control of Stochastic Gene Expression by Host Factors at the HIV Promoter. *PLOS Pathogens*, 2009; 1-18

84. Schwartz S et al. Rapidly and slowly replicating human immunodeficiency virus type 1 isolates can be distinguished according to target-cell tropism in T-cell and monocyte cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989; 86: 7200-7203.
85. Felber G K, Hadzopoulou-Cladaras M, Claradas C, Copeland T, and Pavlakis G N. Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989; 86: 1495-1499.
86. Cochrane A, Kramer R, Ruben S, Levine J, and Rosen C A. The human immunodeficiency virus rev protein is a nuclear phosphoprotein. *Virology*, 1989; 17: 264-266.
87. Venkatesh L K, Mohammed S, and Chinnadurai G. Functional domains of the I-HIV-1 rev gene required for transregulation and subcellular localization. *Virology*, 1990; 176: 39-47
88. Farnet C, and Haseltine W. Integration of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990; 87: 4164-4168.
89. Emerman M, Vazeux R, and Peden K. The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell*, 1989; 57: 115-116.
90. Hammarskjold M-I, Heimer J, Hammarskjold B, Sangwan L, Albert I, and Rekosh D. Regulation of human immunodeficiency virus env expression by the rev gene product. *Journal of Virology*, 1989; 63: 1959-1966.
91. Malim M H, Hauber J, Les Y, Maizel J V, and Cullen B R. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*, 1989; 338: 254-257.
92. Omoszlan S, and Luftig R B, Retroviral proteinases. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Campans R W, Cooper M, Koprowski H, Meichers F, Nussenzweig Y, Oldstone M, Olenes S, Potter M, Saedlere H, Vogt P K, Wagner H, and Wilson I, eds

Springer-Verlag, 1990.

93. Gottlinger H O, Dorfman T, Sodroski J G, and Haseltine W A. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991; 88.
94. Terwilliger E F et al. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpr. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989; 86: 5163-5167.
95. Betty Poon and Irvin S. Y. Chen. Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Vpr Enhances Expression from Unintegrated HIV-1 DNA. *Journal of Virology*, 2003; 77: 3962-3972.
96. Lehman DA, Farquhar C. Biological mechanisms of vertical human immunodeficiency virus (HIV-1) transmission. *Reviews in medical virology* 2007; Jun 1.
97. Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD. Increase viral burden cytophthocity correlate temporally with CD4 T lymphocytes decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1 infected individuals. *Journal of Virology* 1993; 67: 1772-1777.
98. Popovic M, Gartner S. Isolation of HIV-1 from monocyte not T-lymphocyte. *Lancet* 1987; 11: 916.
99. Tschachler E, Popovic M. Epidermal Langerhans cells: a target for HTLVIII/LAV infection. *The Journal of investigative dermatology* 1987; 88: 233-237.
100. Armstrong JA, Horne R. Follicular dendritic cells and virus-like particles in AIDS-related lymphadenopathy. *Lancet* 1984; 2: 370-372.
101. Salahuddin SZ, Rose MN, Gallo RC. Human T lymphotropic virus type III infection of human alveolar macrophages. *Blood* 1986; 68: 281-284.
102. Pomerantz RJ, De La Monte SM. Infection of the retina by human immunodeficiency virus type 1. *New England Journal of Medicine* 1987; 317:643-1647.
103. Pomerantz RJ, De La Monte SM, Dorngan SP. Human immunodeficiency virus infection of the uterine cervix. *Annals of internal medicine* 1988; 108:321-327.
104. Koenig S, Orestein JM. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 1986; 233: 1089-1093.

105. Tersmette M, Al BJ et al. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Journal of Virology* 1988; 62: 2026-2032.
106. Tersmette M, Gruters RA et al. Evidence for a role of virulent human Immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of AIDS: studies on sequential HIV isolates. *Journal of Virology* 1989; 63: 2118-2125.
107. Tersmette M, Lange J, De Geode R et al. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 1989; 1: 983-985.
108. Collman R, Gregoty SA, Balliet JW et al. An infectious molecular clone of an usual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* 1992; 66: 7517-7521.
109. Levy J, Shimabukuro J, McHug T et al. AIDS-associated retroviruses (ARV) can productively infect other cells besides human T-helper cells. *Virology* 1985; 147: p. 916.
110. Saag MS, Hahn BH, Gibbons J et al. Extensive variation of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *Nature*, 1988; 334: 440-444.
111. Goodenow M, Huet T, Laurin W et al. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitution. *AIDS*, 1989; 2: 344-352.
112. Desai SM, Devare SG. Molecular cloning and primary nucleotide sequence analysis of a distinct HIV-1 isolate reveal significant divergence in its genomic sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986; 83: 8380-8384.
113. Preston BD, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, 1988; 242: 1168-1171.
114. Preston B. Reverse transcriptase fidelity and HIV-1 variation. *Science*, 1997; 275: 228-231.
115. Zwart G, Van der Hoek L, Valk M et al. Antibody responses to HIV-1 envelope and gag epitopes in HIV-1 seroconverters with rapid versus slow disease progression. *Virology*, 1994; 201: 285-293.
116. Clavel F, Hoggan MD, Willey RL et al. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 1989; 63: 1455-1459.
117. Fenyo EM, Chiodi F, Asjo B. Distinct replicative and cytopathic characteristics of HIV-1 isolates. *Journal of Virology*, 1988; 62: 4414-4419.
118. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA et al. HIV-1 nomenclature proposal. In: *Human retroviruses and AIDS 1999: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid*

- sequences. Kuiken CL, Foley B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx PA, et al, eds. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.
119. Anderson JP, Rodrigo AG, Learn GH, et al. Testing the hypothesis of a recombinant origin of human immunodeficiency virus type 1 subtype E. *J Virol* 2000; 74: 10752-10765.
 120. Paraskevis D, Magiorkinis M, Vandamme AM et al. Re-analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 isolates from Cyprus and Greece, initially designated 'subtype I', reveals a unique complex A/G/H/K/? mosaic pattern. *J Gen Virol* 2001; 82:575-580.
 121. Thomson MM, Delgado E, Manjón N et al. HIV-1 genetic diversity in Galicia, Spain: BG intersubtype recombinant viruses are circulating among injecting drug users. *AIDS* 2001; 15: 509–516.
 122. Delgado E, Thomson MM, Villahermosa ML et al. Identification, by analysis of near full-length sequences, of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, exhibiting a pseudotype-like virion structure. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29: 536–543.
 123. Esteves A, Parreira R, Venenno T et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: high prevalence of non-B subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18: 313–325.
 124. Mokili J, Rogers M, Carr J et al. Identification of a novel clade of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18:817-823.
 125. HIV Sequence Database. Los Alamos National Laboratory, NM: <http://hiv-web.lanl.gov>
 126. Liu Y, Li L, Bao Z, Li H, Zhuang D, Liu S, Wang X, Li T, Jia L, Yang S, Li J. Identification of a novel HIV type 1 circulating recombinant form (CRF52_01B) in Southeast Asia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28:1357-61.
 127. Chow WZ, Al-Darraji H, Lee YM, Takebe Y, Kamarulzaman A, Tee KK. Genome sequences of a novel HIV-1 CRF53_01B identified in Malaysia. *J Virol*. 2012;86:11398-9.
 128. Ng KT, Ong LY, Takebe Y, Kamarulzaman A, Tee KK. Genome sequence of a novel HIV-1 circulating recombinant form 54_01B from Malaysia. *J Virol*. 2012;86:11405-6.
 129. Ibe S, Yokomaku et al. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;54:241-247.
 130. Carr JK, Avila M, Gomez Carrillo M, et al. Diverse BF recombinants have spread widely

- since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS* 2001; 15:F41-47.
131. De Sá Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM, et al. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22: 1-13.
132. Sanabani S, Kleine Neto W, Kalmar EM, et al. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in São Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol* 2006; 6:368-377.
133. Ruchansky D, Casado C et al. Identification of a new HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF38_BF1) in Uruguay. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009 ;25:351-356
134. Guimarães ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS* 2008; 22:433-455.
135. Rios M, Delgado E et al. Antiretroviral drug resistance and phylogenetic diversity of HIV-1 in Chile. *J Med Virol*. 2007;79:647-656.
136. Sanabani SS, Pastena ER et al. A Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. *J Virol*. 2010;7:74.
137. Thomson MM, Villahermosa ML, Vázquez-de Parga E et al. Widespread circulation of a B/F intersubtype recombinant form among HIV-1-infected individuals in Buenos Aires, Argentina. *AIDS* 2000; 14: 897–899.
138. Thomson MM, Delgado E, Herrero I et al. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol* 2002; 83: 107–19.
139. Fernández-García A, Pérez-Alvarez L et al. Identification of a new HIV type 1 circulating BF intersubtype recombinant form (CRF47_BF) in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010 ;26:827-832.
140. Thomson MM, Casado G, Posada D, et al. Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18_cpx) of Central African origin in Cuba. *AIDS* 2005; 19:1155-1163.
141. Cuevas MT, Ruibal I, Villahermosa ML et al. High HIV-1 genetic diversity in Cuba. *AIDS* 2002; 16: 1643-1653.
142. Pérez L, Thomson MM, Bleda MJ, et al. HIV Type 1 molecular epidemiology in Cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent expansion of BG intersubtype recombinant forms. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:724-733.
143. Tovanabutra S, Watanaveeradej V, Viputtikul K et al. A new circulating recombinant form,

- CRF15_01B, reinforces the linkage between IDU and heterosexual epidemics in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; 19: 561-567.
144. Tee KK, Li XJ, Nohtomi K, et al. Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 2006; 43:523-529.
145. Tovanabutra S, Kijak GH, Beyrer C, et al. Identification of CRF34_01B, a second circulating recombinant form unrelated to and more complex than CRF15_01B, among injecting drug users in northern Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; 23: 829-832.
146. Li Y, Tee KK et al. Identification of a novel second-generation circulating recombinant form (CRF48_01B) in Malaysia: a descendant of the previously identified CRF33_01B. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;54:129-136.
147. Oon Tek Ng, Lindsay M. Eyzaguirre, et al. Identification of New CRF51_01B in Singapore Using Full Genome Analysis of Three HIV Type 1 Isolates. *AIDS Research and Human Retroviruses*. May 2012, 28(5): 527-530.
148. Adojaan M, Kivisild T, Männik A, et al. Predominance of a rare type of HIV-1 in Estonia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 39: 598-605.
149. Triques K, Bourgeois A, Vidal N, et al. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 139-151.
150. Janssens W, Salminen MO, Laukkanen T, et al. Near full-length genome analysis of HIV type 1 CRF02_AG subtype C and CRF02_AG subtype G recombinants. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000, 16:1183-1189.
151. Yamaguchi J, Badreddine S et al. Identification of new CRF43_02G and CRF25_cpx in Saudi Arabia based on full genome sequence analysis of six HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008;24:1327-1335.
152. Osmanov S, Pattou C, Walker N, et al. WHO-UNAIDS network for HIV Isolation and Characterization. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29: 184–190.
153. Tomaras, G. D. et al. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J. Virol.* 82, 12449–63 (2008).
154. Moore, P. L., Gray, E. S. & Morris, L. Specificity of the autologous neutralizing antibody

- response. *Curr Opin HIV AIDS* 4, 358–363 (2010).
155. Bunnik, E. M., Pisas, L., Nuenen, A. C. Van & Schuitemaker, H. Autologous Neutralizing Humoral Immunity and Evolution of the Viral Envelope in the Course of Subtype B Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol.* 82, 7932–7941 (2008).
 156. Davis, K. L. et al. High titer HIV-1 V3-specific antibodies with broad reactivity but low neutralizing potency in acute infection and following vaccination. *Virology* 387, 414–26 (2009).
 157. McMichael, A. J., Ch, B., Ph, D. & Haynes, B. F. Acute HIV-1 Infection. *NEJM* 364, 1943–1954 (2011).
 158. Hammer SM, Squires KE, Hughes MD et al. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimetre or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *New England Journal of Medicine*, 1997; 337: 725-733.
 159. Gulick RM, Mellors JW, Havlir D et al. Treatment with indinavir, zidovudine and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *New England Journal of Medicine*, 1997; 337: 734-739.
 160. Chen LF, Hoy J and Lewin SR. Ten years of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. *The Medical journal of Australia* 2007; 186: 146-151.
 161. Rabound JM, Montaner JSG et al. Issues in the design of trials of therapy that use plasma RNA level as an outcome. *Journal of Infectious Diseases*, 1997; 175: 576-582.
 162. Clavel F, and Hance A. HIV drug resistance. *New England Journal of Medicine*, 2004; 350: 1023-1035.
 163. BHIVA Guidelines Co-Ordinating Committee. British HIV Association for antiretroviral treatment of HIV sieropositive individuals. *Lancet* 1997; 349:1092.
 164. Thiebaud R, Dabis F, Malvy D, et al. Serum triglyceride, HIV infection and highly active antiretroviral therapy. Aquitaine cohort, France 1996 to 1998. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, 2000; 23: 261–265
 165. Carr A, Samaras K, Burton S, et al. A syndrome of lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS* 1998; 12: 51–58.
 166. James J. Kohler and William Lewis. A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. *Environmental and molecular mutagenesis* 2007; 48: 166-172.
 167. L. Waters, L. John, M. Nelson, et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: a review. *International journal of clinical practice* 2007; 61: 105–118.

168. Hurst M and Faulds D. Lopinavir. *Drugs*, 2000; 60: 1371-1381
169. Hicks C, and Gulick R M. Raltegravir: The First HIV Type 1 Integrase Inhibitor. *Clinical Infectious Diseases*, 2009; 48:931–939.
170. Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, et al. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 2000; 287:646–50.
171. Grinsztejn B, Nguyen BY, Katlama C, et al. Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369:1261–9.
172. Grinsztejn B, Nguyen B, Katlama C, et al. 48-Week efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with tripleclass resistant virus [abstract H-713]. In: Program and abstracts of 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Chicago). Washington, DC: American Society for Microbiology, 2007.
173. Steigbigel R, Cooper D, Kumar P, et al. Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine*, 2008; 359:339–54.
174. Cooper DA, Steigbigel RT, Gatell JM, et al. Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine*, 2008; 359:355–65.
175. Hunt J S, B.S., and Romanelli F, Pharm.D., M.P.H. Maraviroc, a CCR5 Coreceptor Antagonist That Blocks Entry of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Pharmacotherapy* 2009; 29: 295–304
176. Van der Ryst E, Cooper D, Konourina I, et al. Efficacy of maraviroc in combination with at least one other potent new antiretroviral drug: 24-week combined analysis of the MOTIVATE 1 and 2 studies. Presented at the 4th international AIDS society conference on HIV pathogenesis, treatment and prevention, Sydney, Australia, July 22–25, 2007
177. Gulick RM, van der Ryst E, Lampiris H, et al. Efficacy and safety of oncedaily (QD) compared with twice-daily (BID) maraviroc plus optimized background therapy (OBT) in treatment-experienced patients infected with CCR5-tropic HIV-1: 24-week combined analysis of the MOTIVATE 1 and 2 studies. Presented at the 4th international AIDS society conference on HIV pathogenesis, treatment and prevention, Sydney, Australia, July 22–25, 2007.
178. Pfizer, Inc. Selzentry (Maraviroc) package insert. New York, NY; August 2007.
179. Richmann DD. HIV Therapeutics. *Science*, 1996; 272: 1886-1888.
180. Roche Laboratories Inc., Trimeris Inc. Fuzeon™ (enfuvirtide) for injection: complete product information (US) [online] Disponibile da URL:

<http://www.rocheusa.com/products/fuzeon/pi.pdf>.

181. Meyerhans A, Cheynier R, Albert J, et al. Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell*, 1989; 58: 901-910.
182. Vella S. Clinical implication of resistance to antiretroviral drugs. *AIDS Clinical Care*, 1997; 9: 45-50.
183. Berger, E. a, Murphy, P. M. & Farber, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 657–700 (1999).
184. Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science*. 1991;253:71–4
185. de Jong JJ, Goudsmit J, Keulen W, et al. Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J Virol.* 1992;66:757–65
186. Milich L, Margolin BH, Swanstrom R. Patterns of amino acid variability in NSI-like and SI-like V3 sequences and a linked change in the CD4-binding domain of the HIV-1 Env protein. *Virology*. 1997;239:108–18
187. Huang W, Toma J, Fransen S, et al. Coreceptor tropism can be influenced by amino acid substitutions in the gp41 transmembrane subunit of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol.* 2008;82:5584–93
188. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002;417:95–8
189. Dunfee RL, Thomas ER, Wang J, et al. Loss of the N-linked glycosylation site at position 386 in the HIV envelope V4 region enhances macrophage tropism and is associated with dementia. *Virology*. 2007;367:222–34
190. Meltzer MS, Nakamura M, Hansen BD, Turpin JA, Kalter DC, Gendelman HE. Macrophages as susceptible targets for HIV infection, persistent viral reservoirs in tissue, and key immunoregulatory cells that control levels of virus replication and extent of disease. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1990 Aug;6(8):967-71.
191. Massari FE, Poli G, Schnittman SM, Psallidopoulos MC, Davey V, Fauci AS. In vivo T lymphocyte origin of macrophage-tropic strains of HIV. Role of monocytes during in vitro isolation and in vivo infection. *J Immunol.* 1990 Jun 15;144(12):4628-32.
192. Frange P, Galimand J, Goujard C, Deveau C, Ghosn J, Rouzioux C, Meyer L, Chaix ML. High frequency of X4/DM-tropic viruses in PBMC samples from patients with primary HIV-1 subtype-B infection in 1996-2007: the French ANRS CO06 PRIMO Cohort Study. *J*

- Antimicrob Chemother. 2009;64(1):135-41.
193. Verhofstede C, Brudney D, Reynaerts J, Vaira D, Fransen K, De Bel A, Seguin-Devaux C, De Wit S, Vandekerckhove L, Geretti AM. Concordance between HIV-1 genotypic coreceptor tropism predictions based on plasma RNA and proviral DNA. *HIV Med.* 2011;12(9):544-52
194. Chalmet K, Dauwe K, Foquet L, et al. Presence of CXCR4-using HIV-1 in patients with recently diagnosed infection: correlates and evidence for transmission. *J Infect Dis* 2012; 205:174–184
195. Shepherd JC, Jacobson LP, Qiao W, et al. Emergence and persistence of CXCR4-tropic HIV-1 in a population of men from the Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect Dis* 2008; 198:1104–1112
196. Linee Guida Italiane sull'utilizzo dei farmaci antiretrovirali e sulla gestione diagnostico-clinica delle persone con infezione da HIV-1. (2012)
197. Panel on Antiretroviral Guidelines For Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral agents in HIV-1 Infected Adults and Adolescents. (2012) Department of Health and Human Services. Disponibile su: <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>.
198. Vandekerckhove, L. P. R. et al. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *Lancet Infect. Dis.* 11, 394–407 (2011).
199. Araújo, L. A. L. & Almeida, S. E. M. HIV-1 diversity in the envelope glycoproteins: implications for viral entry inhibition. *Viruses* 5, 595–604 (2013).
200. Thielen, A. et al. Improved prediction of HIV-1 coreceptor usage with sequence information from the second hypervariable loop of gp120. *J. Infect. Dis.* 202, 1435–43 (2010).
201. Svicher, V. et al. Performance of genotypic tropism testing in clinical practice using the enhanced sensitivity version of Trofile as reference assay: results from the OSCAR Study Group. *New Microbiol.* 33, 195–206 (2010).
202. Svicher, V. et al. Performance of genotypic tropism testing on proviral DNA in clinical practice: results from the DIVA study group. *New Microbiol.* 35, 17–25 (2012).
203. Knapp, D. J. H. F. et al. Factors influencing the sensitivity and specificity of conventional sequencing in human immunodeficiency virus type 1 tropism testing. *J. Clin. Microbiol.* 51, 444–51 (2013).
204. Tu, E. et al. Results of external quality assessment for proviral DNA testing of HIV tropism in the Maraviroc Switch collaborative study. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2063–71 (2013).
205. Hogg RS, Yip B, Chan KJ, et al. Rates of disease progression by baseline CD4 cell count

- and viral load after initiating triple-drug therapy. *J Am Med Assoc* 2001; 286:2568–2577
- 206.Symons J, Vandekerckhove L, Paredes R, et al. Impact of triplicate testing on HIV genotypic tropism prediction in routine clinical practice. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:606–612
- 207.De Luca A. HIV-1 co-receptor tropism evolution in naive patients undergoing successful ART: concordance of DNA vs. RNA and triplicate versus singlicate population sequencing. *Rev Antivir Ther Infect Dis*. Barcelona; 2012
- 208.Clevestig P, Pramanik L, Leitner T, Ehrnst A. CCR5 use by human immunodeficiency virus type 1 is associated closely with the gp120 V3 loop N-linked glycosylation site. *J Gen Virol*.2006 Mar;87(Pt 3):607-12.
- 209.Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. Structural dynamics of HIV-1 envelope Gp120 outer domain with V3 loop. *PLoS One*. 2012;7(5):e37530. Epub 2012 May 18.
- 210.Mellors, J. W., Rinaldo, C. R. J., Gupta, P. & Al., E. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. 222, 1167 (1996).
- 211.Mellors, J. W., Munoz, A., Giorgi, J. V. & Al., E. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 126, 946–954 (1997).
- 212.Hulgan, T. et al. CD4 lymphocyte percentage predicts disease progression in HIV-infected patients initiating highly active antiretroviral therapy with CD4 lymphocyte counts >350 lymphocytes/mm³. *J. Infect. Dis*. 192, 950–7 (2005).
- 213.Goicoechea, M. & Haubrich, R. CD4 lymphocyte percentage versus absolute CD4 lymphocyte count in predicting HIV disease progression: an old debate revisited. *J. Infect. Dis*. 192, 945–7 (2005).
- 214.Hulgan, T. et al. Absolute count and percentage of CD4+ lymphocytes are independent predictors of disease progression in HIV-infected persons initiating highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis*. 195, 425–31 (2007).
- 215.Giorgi, J. V., Liu, Z., Hultin, L. E. & Al., E. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6, 904 (1993).
- 216.Vanhems, P. et al. Severity and prognosis of acute human immunodeficiency virus type 1 illness: a dose-response relationship. *Clin. Infect. Dis*. 26, 323–9 (1998).
- 217.Vanhems, P. et al. Incubation time of acute human immunodeficiency virus (HIV) infection and duration of acute HIV infection are independent prognostic factors of progression to

- AIDS. *J. Infect. Dis.* 182, 334–7 (2000).
218. Barbour, J. D. et al. Higher CD4+ T cell counts associated with low viral pol replication capacity among treatment-naive adults in early HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 190, 251–6 (2004).
219. Report, A. & Bank, B. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. *NEJM* 340, 1715–1722 (2013).
220. Mani I, Cao H, Hom D, Johnson JL, Mugerwa RD, Travers KU, Caliendo AM, Walker BD, Kanki PJ. Plasma RNA viral load as measured by the branched DNA and nucleic acid sequence-based amplification assays of HIV-1 subtypes A and D in Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999 Oct 1;22(2):208-9.
221. Vasan, A. et al. Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype. *Clin. Infect. Dis.* 42, 843–52 (2006).
222. Baeten, J. M. et al. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J. Infect. Dis.* 195, 1177–80 (2007).
223. Kiwanuka, N. et al. Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 197, 707–13 (2008).
224. Cunningham, A. L. et al. A Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolate from an Infected Person Homozygous for CCR5 Δ 32 Exhibits Dual Tropism by Infecting Macrophages and MT2. *J. Virol.* 76, 3114–3124 (2002).
225. Hedskog, C., Brodin, J., Heddini, A., Albert, J. & Mild, M. Longitudinal Ultradeep Characterization of HIV Type 1 R5 and X4 Subpopulations in Patients Followed from Primary Infection to Coreceptor Switch. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 29, 1237–1244 (2013).
226. Mendoza, C. De et al. Prevalence of X4 Tropic HIV-1 Variants in Patients With Differences in Disease Stage and Exposure to Antiretroviral Therapy. 1046, 1040–1046 (2007).
227. Toma, J. et al. Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Populations Containing CXCR4-Using Variants. 25, (2009).
228. Bunnik, E. M. et al. Detection of inferred CCR5- and CXCR4-using HIV-1 variants and evolutionary intermediates using ultra-deep pyrosequencing. *PLoS Pathogens* 7 (2011).
229. Soulié, C. et al. Presence of HIV-1 R5 viruses in cerebrospinal fluid even in patients harboring R5X4/X4 viruses in plasma. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 51, 60–4 (2009).
230. Koot, M. et al. Prognostic Value of HIV-1 Syncytium-inducing Phenotype for Rate of CD4

- + Cell Depletion and Progression to AIDS. *Ann. Intern. Med.* 118, 681–688 (1993).
231. Richman, D. & Bozzette, S. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* 169, 968–974 (1994).
232. Daar, E. S. et al. Baseline HIV type 1 coreceptor tropism predicts disease progression. *Clin. Infect. Dis.* 45, 643–9 (2007).
233. Hunt, P. W. et al. Prevalence of CXCR4 Tropism among Antiretroviral-Treated HIV-1 – Infected Patients with Detectable Viremia. *J Infect Dis* 194, 926–930 (2006).
234. Swenson, L. C. et al. Deep V3 sequencing for HIV type 1 tropism in treatment-naive patients: a reanalysis of the MERIT trial of maraviroc. *Clin. Infect. Dis.* 53, 732–42 (2011).
235. Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol.* 2009 Apr;25(4):195-203. Epub 2009 Feb 3.
236. Pérez-Álvarez, L. et al. Predominance of CXCR4 tropism in HIV-1 CRF14_BG strains from newly diagnosed infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 1–8 (2013). doi:10.1093/jac/dkt305
237. Bunnik, E. M., Pisas, L., Nuenen, A. C. Van & Schuitemaker, H. Autologous Neutralizing Humoral Immunity and Evolution of the Viral Envelope in the Course of Subtype B Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol.* 82, 7932–7941 (2008).
238. BioEdit Home Page <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>
239. LANL (Los Alamos National Lab) Home page <http://www.lanl.gov/>
240. PHYLIP Home Page <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
241. TreePuzzle Home Page <http://www.tree-puzzle.de>
242. Galloway, P., Swingle, S., Aiken, C. & Al., E. HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal Tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* 80, 379–388 (1995).
243. Lewis, P. & Emerman, M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses by not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 68, 510–516 (1994).
244. Contag, C., Dewhurst, S., Viglianti, G. & Al., E. in Gall. RC., Jay G, eds. *Hum. retroviruses.* 245–276 (1991).
245. Araújo, L. A. L. & Almeida, S. E. M. HIV-1 diversity in the envelope glycoproteins: implications for viral entry inhibition. *Viruses* 5, 595–604 (2013).
246. Jiang, X. et al. Conserved structural elements in the V3 crown of HIV-1 gp120. *17*, 955–962 (2010).
247. Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA et al. The emerging genetic diversity of HIV: The importance of global surveillance for diagnostics, research, and prevention. *JAMA* 1996;

- 275: 210-216.
248. Amornkul PN, Tansuphasawadikul S, Limpakarnjanarat K et al. Clinical disease associated with HIV-1 subtype B and E infection among 2104 patients in Thailand. *AIDS* 1999; 13: 1963-1969.
249. Kilmarx PH, Limpakarnjanarat K, Kaewkungwal J et al. Disease progression and survival with human immunodeficiency virus type 1 subtype E infection among female sex workers in Thailand. *J Infect Dis* 2000; 181: 1598-1606.
250. Neilson JR, John GC, Carr JK et al. Subtypes of human immunodeficiency virus type and disease stage among women in Nairobi, Kenya. *J Virol* 1999; 73: 4393-4403.
251. Kaleebu PFN, Mahe C, Yirell D et al. The role of HIV-1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1 positive individuals in Uganda. XIII International Conference on AIDS. Durban, July 2000 [abstract A3079].
252. Chew CB, Herring BL, Zheng F et al. Comparison of three commercial assay for the quantification of HIV-1 RNA in plasma from individuals infected with different HIV-1 subtypes. *J Clin Virol* 1999; 14: 87-94.
253. Burgisser P, Vernazza P, Flepp M et al. Performance of five different assays for the quantification of viral load in persons infected with various subtypes of HIV-1. Swiss HIV Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23:138-144.
254. Santoro MM, Armenia D, Fabeni L, Santoro M, Gori C, Forbici F, Svicher V, Bertoli A, Dori L, Surdo M, Balestra E, Palamara G, Girardi E, Angarano G, Andreoni M, Narciso P, Antinori A, Ceccherini-Silberstein F, Perno CF. The lowest X4 Geno2Pheno false-positive rate is associated with greater CD4 depletion in HIV-1 infected patients. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Aug;18(8):E289-98. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03905.x. Epub 2012 Jun 8.

7. RINGRAZIAMENTI

.....seduta alla mia scrivania, occupata negli ultimi sviluppi della tesi, ancora non mi rendo conto di essere arrivata alla fine di questo percorso che ha coinvolto tutta me stessa negli ultimi tre anni. Guardandomi indietro mi rendo conto che tante cose nella mia vita e dentro di me sono cambiate: il mio modo di pensare, di affrontare le cose, il mio modo di relazionarmi agli altri. Ripercorrendo la mia strada, non posso fare a meno di pensare a quante persone durante il mio cammino mi hanno aiutato e spronato in questo lavoro, a cui va il mio doveroso GRAZIE!

Al Dr. Stefano Rusconi, a cui devo la realizzazione di questo lavoro di tesi. Per avermi insegnato tanto grazie alla sua esperienza clinica e non solo. Per avermi aiutata in tutti i momenti negativi che ci son stati nel mio cammino, grazie alla sua umanità e capacità di aiutare.

Al Prof. Massimo Galli, per avermi accolta nel suo Dipartimento.

A Silvia, mia compagna di avventura, nonché amica e valida collaboratrice per avermi aiutata in questo lavoro di tesi ed avermi supportata e “sopportata” con sconfinata pazienza nei momenti critici.

A Giulia, per aver condiviso con me i momenti più gioiosi e critici della stesura di questo lavoro, soprattutto per aver fatto da “spola” tra il mio mondo biologico ed il suo mondo clinico.

A Letizia, per l’aiuto prezioso per l’analisi statistica e l’incredibile disponibilità.

Ad Alessia, per avermi aiutato con sconfinata pazienza per l’analisi filogenetica ed il prezioso aiuto di correzione di questo lavoro di tesi.

A Chiara per avermi aiutata in tante e varie occasioni sia dal punto di vista umano, sia per quanto riguarda i momenti critici che ho incontrato per la stesura dell’analisi filogenetica.

A Paola per avermi insegnato tanto e per essere stata la mia “guru” della biologia cellulare.

A Consuelo, compagna di dottorato, per aver trascorso con me questi ultimi giorni di delirio totale.

A mio marito, per avermi supportato, ma soprattutto aver “sopportato” tutti i miei sfoghi con amore e pazienza. Per esserci stato, sempre e comunque in tutti i momenti sia felici che non. Per non avermi mai fatto pesare nulla, ma avermi sempre incentivato ad andare avanti e fare sempre meglio.

Alla mia famiglia che , anche se lontana, mi è sempre stata vicina in ogni momento.

Alla mia amica foodblogger Tina, perché con il suo entusiasmo mi ha spronato ad andare sempre avanti a testa alta anche nei momenti più critici e con il suo affetto è riuscita anche se a distanza di km a farmi sentire coccolata, come una sorella!!!

Alla mia amica foodblogger Pierangela, perché anche se riusciamo a vederci poco (a causa dei nostri innumerevoli impegni!), ci sentiamo nei momenti più disparati della giornata (tu sai a cosa mi riferisco!) e riusciamo a condividere tutto!

Alla mia amica Maria Grazia, che se pur lontana, mi è sempre stata vicina con consigli salentini ad hoc.