



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

QUANTIFICAZIONE DI HIV-1 DNA PROVIRALE IN PAZIENTI NAÏVE E CRONICAMENTE INFETTI MEDIANTE ADATTAMENTO DI UN SAGGIO COMMERCIALE PROGETTATO PER HIV-RNA

QUANTIFICATION OF HIV-1 PROVIRAL DNA IN NAÏVE AND CRONICALLY INFECTED PATIENTS, BY A MODIFIED COMMERCIAL ASSAY DSIGNED FOR HIV-RNA

Tesi di Laurea Magistrale di
Longo Roberta

Relatore Chiar.mo Prof.
Bagnarelli Patrizia

Correlatore:
Di Sante Laura

Sessione Straordinaria

Anno accademico 2018/2019

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 Virus HIV	
1.2 Classificazione	
1.3 Epidemiologia	
2. MORFOLOGIA E STRUTTURA DEL VIRIONE.....	9
2.1 Struttura del virione	
2.2 Genoma virale	
2.2.1 Geni strutturali	
2.2.2 Geni regolatori	
2.2.3 Geni accessori	
3. CICLO REPLICATIVO.....	16
3.1 Adsorbimento e replicazione	
3.2 Trascrizione del genoma virale	
3.3 Integrazione del DNA	
3.4 Espressione e regolazione dei geni virali	
3.5 Assemblaggio e liberazione del virus	
4. PATOGENESI E STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE.....	25
4.1 Manifestazioni cliniche	
4.2 Diagnosi di laboratorio	
5. TERAPIA E CONTROLLO.....	30
6. IL DNA PROVIRALE DI HIV.....	32

7. RAZIONALE DELLO STUDIO.....	38
8. MATERIALI E METODI.....	40
7.1 Estrazione	
7.2 Amplificazione mediante real-time PCR	
7.3 Curva di calibrazione	
7.4 Sensibilità analitica	
7.5 Campioni clinici	
7.6 Colture cellulari per il dosaggio di hTERT	
7.7 Analisi statistica	
9. RISULTATI.....	50
9.1 Calibrazione del sistema: creazione di una curva di calibrazione master per HIV-1 DNA	
9.2 Sensibilità analitica	
9.3 Campioni clinici	
10. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	62
11. BIBLIOGRAFIA.....	69
12. RINGRAZIAMENTI.....	79

1. INTRODUZIONE

1.1 Il virus HIV

Intorno agli anni '70 si registrò un incremento di pazienti con particolari disfunzioni immunologiche, linfadenomegalia, infezioni opportunistiche o con rare forme tumorali. Circa una decina di anni dopo si osservò, che queste alterazioni riguardavano soprattutto particolari categorie di persone tra cui omosessuali, tossicodipendenti che facevano uso di droghe per via endovenosa con scambio di ago, emofilici, pazienti che avevano ricevuto trasfusioni di sangue, ecc. Questa nuova malattia, quindi, si trasmetteva attraverso il contatto con sangue o materiale biologico infetto e furono proposti diversi microorganismi responsabili della sindrome. Solo più tardi, nel 1983, il virus venne isolato per la prima volta, nei linfonodi di un paziente che mostrava una linfadenopatia generalizzata di origine sconosciuta che sarebbe poi stata ricondotta, ad una infezione a carico di un nuovo virus (1), quello che oggi conosciamo con il nome di virus dell'immunodeficienza umana (HIV).

In tempi più recenti, si è compreso che l'epidemia globale di HIV è il risultato di un'**infezione cross-specie** a carico di lentivirus di scimpanzé, *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV_{cpz}). Pertanto, l'infezione è una zoonosi nella quale il suo agente eziologico ha superato la barriera di specie arrivando all'uomo, si è diffuso e, col tempo, si è adattato all'ospite umana (2).

È stato, inoltre, osservato che la diversità genetica del virus tende ad aumentare dell'1% all'anno: questo è dovuto al fatto che HIV è un virus con una grande capacità di **mutare** a causa ad esempio di errori durante la retrotrascrizione, all'alta frequenza di ricombinazione, all'elevato numero di prole virale prodotta e di individui infettati. Per questo quando si parla di popolazione virale

si deve intendere una entità non omogenea, piuttosto complessa e dinamica, denominata *quasispecie*.

Il virus dell'HIV è in grado di infettare una varietà di cellule che esprimono sulla superficie recettori CD4, e cioè i linfociti T CD4⁺, ma anche monociti e macrofagi. Pertanto, HIV è capace di indurre effetti devastanti sullo stato immunitario dell'ospite determinando, col tempo, l'effetto patologico più eclatante dell'infezione e cioè la progressione clinica verso la sindrome da immunodeficienza acquisita - AIDS (3).

1.2 Classificazione

L'HIV è un retrovirus appartenente alla sottofamiglia dei Lentivirus. La famiglia dei Retrovirus comprende tre sottofamiglie:

- ***Oncovirinae***: include diversi generi tra cui *Alfaretrovirus*, *Betaretrovirus* e *Gammaretrovirus* (che sono considerati virus semplici in quanto il loro genoma codifica solo per i geni *gag*, *pol* ed *env*) e *Deltaretrovirus* ed *Epsilonretrovirus* (considerati virus complessi poiché codificano anche per proteine accessorie con funzione regolatrice).
- ***Lentivirinae***, anch'essi sono considerati virus complessi. Essi comprendono il genere *Lentivirus*, del quale fanno parte i virus come SIV (immunodeficienza della scimmia), FIV (immunodeficienza del gatto) e HIV (immunodeficienza dell'uomo).
- ***Spumavirinae*** che comprende il genere *Spumavirus*, chiamato in questo modo a causa della sua capacità di determinare una caratteristica citopatologica "schiumosa" osservabile in colture cellulari *in vitro*.

La famiglia dei retrovirus comprende anche 7 generi (classificati in base a similitudini delle sequenze amminoacidiche a livello delle proteine della trascrittasi inversa): 5 dei quali sono stati correlati all'insorgenza di tumori nell'animale e almeno 1 caso (deltaretrovirus) nell'uomo.

In base alle proprietà sierologiche e alla sequenza, i lentivirus isolati dall'uomo sono raggruppati all'interno di due sierotipi:

- **HIV-1**, diffuso ormai in tutto il mondo, comprende 3 gruppi, **M** (Major) responsabile della maggior parte delle infezioni nel mondo e consiste in undici sottotipi denominati dalla A alla D, da F a H e da J a K; il gruppo **N** (*New*) ed il gruppo **O** (*Outlier*) che rimangono confinati in una parte dell'Africa centro-occidentale. Inoltre, il sierotipo HIV-1 è filogeneticamente correlato con il virus SIV_{cpz}

- **HIV-2**, diffuso quasi esclusivamente in alcuni paesi dell'Africa Occidentale, comprende 6 distinte linee filogenetiche, denominate dalla lettera **A** alla **F**. Questo sierotipo invece è filogeneticamente correlato con i virus SIV_{mac} e SIV_{sm}.

HIV-1 e HIV-2, pur avendo un'elevata divergenza nucleotidica, presentano un'organizzazione del genoma quasi identica differendo solo per la presenza di un gene ausiliare: HIV-1 contiene il gene *vpu* ed HIV-2 *vpx*. Inoltre, confrontando le infezioni a carico dei due sierotipi, HIV-2 determina un periodo di latenza maggiore, una progressione più lenta della malattia, una bassa carica virale e una ridotta capacità di trasmissione rispetto HIV-1 (3).

1.3 Epidemiologia

Al giorno d'oggi HIV/AIDS è la causa principale di morte nell'Africa subsahariana e occupa il quarto posto nel resto del mondo.

UNAIDS, nel 2018, ha stimato che circa 75 milioni di persone sono state infettate da HIV dall'inizio dell'epidemia ad oggi, provocando la morte di circa 32 milioni di individui. Inoltre, 37 milioni di persone, per la maggior parte adulti ma anche ragazzi e bambini con un'età inferiore a 15 anni, convivono tutt'oggi con questa infezione e di essi circa 23 milioni hanno accesso alla terapia antiretrovirale (4).

Per quanto riguarda la distribuzione degli individui affetti da HIV (Figura 1), UNAIDS ha stimato che:

- 20.6 milioni in Africa orientale e meridionale;
- 5.9 milioni in Asia e Pacifico;
- 5 milioni in Africa occidentale e centrale;
- 1.9 milioni in America Latina;
- 340.000 ai Caraibi;
- 1.7 milioni in Europa orientale e Asia centrale;
- 240.000 in nord Africa e Medio Oriente;
- 2.2 milioni in Europa occidentale e centrale e Nord America.



Figura 1. Distribuzione globale delle infezioni da HIV.

La prevalenza, a livello globale, dei diversi sottogruppi di HIV-1 è mostrata, invece, in figura 2: per quanto riguarda il **gruppo M**, il sottotipo B predomina nei paesi industrializzati, in America Latina e nei Caraibi; i sottotipi A e D sono più comuni nell’Africa Centrale; il sottotipo C è causa della maggior parte delle infezioni nell’Africa Meridionale, orientale e in Asia; i **gruppi N e O** rimangono confinati in una parte dell’Africa Centro-Occidentale (Gabon e Camerun), con sporadiche infezioni attraverso contatti con persone di quelle regioni (1).

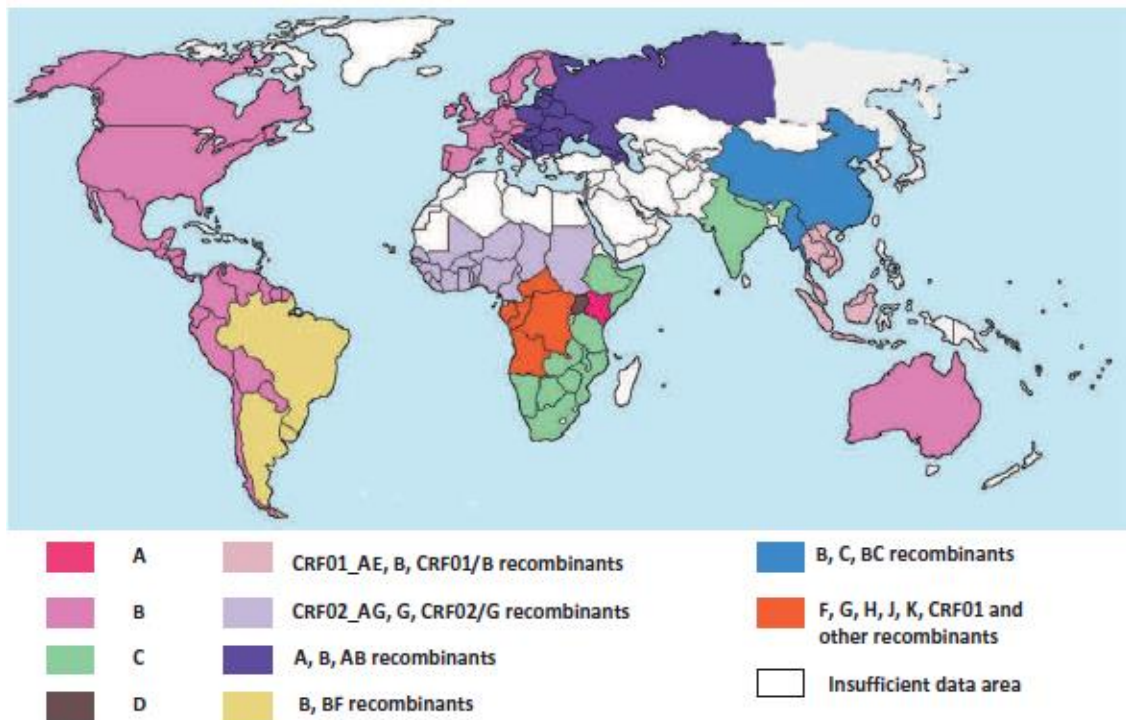


Figura 2. Distribuzione globale dei sottogruppi appartenenti ad HIV-1, con le classi predominanti e CRF in ciascuna regione geografica indicata (1).

2. MORFOLOGIA E STRUTTURA DEL VIRIONE

2.1 Struttura del virione

Con il termine virione si intende una singola particella virale, che può essere isolata e priva di attività metabolica. HIV ha una forma sferica con un diametro di circa 100 nm (Figura 3), presenta un rivestimento esterno denominato envelope, che consiste in un doppio strato fosfolipidico derivato, durante la fase di gemmazione, dalla cellula ospite infettata. La superficie dell'involucro è

caratterizzata da 72 protuberanze a simmetria triangolare (chiamate peplomeri o spike), ciascuna costituita da 4 eterodimeri ognuno contenente una molecola di gp120, ancorata con la porzione COOH- all'estremo NH₂ terminale della proteina gp41 (2).

La **gp120** e la **gp41** sono due glicoproteine virus-specifiche molto importanti: la **gp120** ha il compito di prendere contatto con il recettore della cellula bersaglio e la **gp41**, che è una glicoproteina trans-membrana con attività fusogena, ha il compito di ancorare la gp120 alla membrana lipidica. Le particelle virali possono acquisire anche alcune proteine cellulari, come gli antigeni di istocompatibilità (MHC), acquisite durante la gemmazione del virione.

Al di sotto del doppio strato fosfolipidico sono presenti le proteine della matrice esterna, disposte in modo da formare un inspessimento proteico (7 nm) costituito dalla proteina **p17**, e un capside formato dalla proteina **p24**. Il capside ha una forma tronco-conica la cui base maggiore ha un diametro di circa 60 nm, mentre quella minore, legata alla proteina della matrice, ha un diametro di 20 nm (3).

Il capside contiene, al suo interno, i componenti necessari alla replicazione del virus: 2 copie identiche di RNA a singola catena a polarità positiva (ssRNA+) legati a nucleoproteine (**p7**), gli enzimi trascrittasi inversa (**p51**), integrasi (**p32**), proteasi (**p11**) e molecole di RNA transfer (tRNA) che vengono utilizzate con la funzione di innesco per la trascrittasi inversa.

Nelle particelle virali sono presenti anche degli oligopeptidi generati durante la maturazione del virione, mediante il processamento proteolitico di alcuni precursori (**p160** e **p55**).

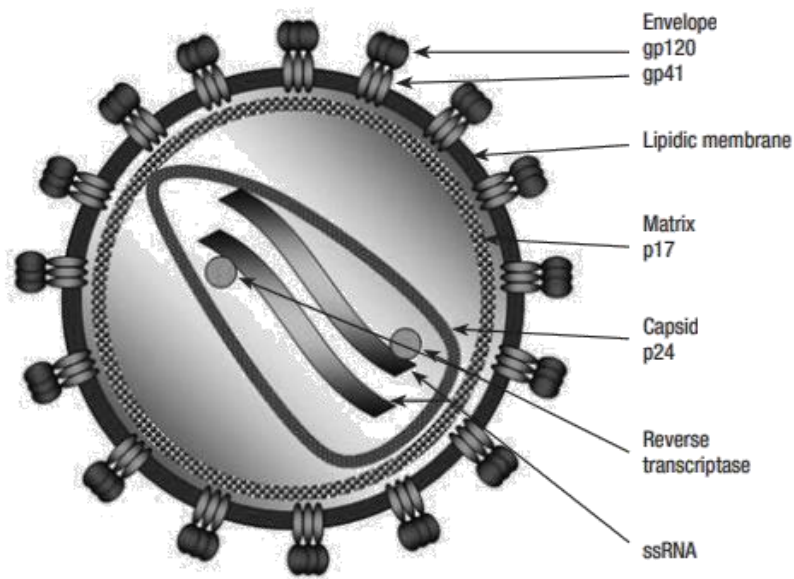


Figura 3. Struttura del virione (5).

2.2 Genoma virale

Il genoma di HIV (circa 9.2 kb) è presente nel virione sotto forma di due copie identiche di ssRNA⁺ mantenute insieme da legami idrogeno che si instaurano tra sequenze complementari.

La trascrizione del genoma di HIV avviene ad opera del sistema trascrizionale della cellula ospite, pertanto i messaggeri presentano alcune delle caratteristiche tipiche di quelli eucariotici tra cui la poliadenilazione all'estremità 3' e la presenza di un gruppo cap (m⁷G5'ppp5'Gmp) al 5'. All'estremità dei filamenti di RNA sono presenti delle sequenze ripetute (*R*) che hanno un ruolo importante durante la retro-trascrizione. Accanto ad esse, nella parte interna si trovano delle sequenze caratteristiche *U* (*uniche*), denominate U3 e U5.

Durante la sintesi del DNA provirale, le sequenze U3 e U5 vengono retro-trascritte ad ambedue le estremità del DNA nascente, dando origine a molecole più lunghe rispetto all'RNA genomico. Pertanto, ad ogni estremità del DNA provirale, saranno presenti delle sequenze identiche U3-R-U5 chiamate *Long Terminal Repeat* (LTR - Figura 4): sequenze non codificanti, altamente conservate, contenenti le informazioni essenziali per l'inserzione del DNA virale in quello della cellula ospite e per la trascrizione del genoma.

Le sequenze LTR fiancheggiano le tre principali *Open Reading Frame* (ORF) del virus che sono *gag*, *pol* ed *env*, e altre sei piccole ORF, *tat* e *rev* essenziali per la replicazione virale, *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef* che sono anche detti geni accessori o ausiliari. La presenza di tutte queste ORF, di fatto, conferisce al virus un livello di complessità molto elevato.

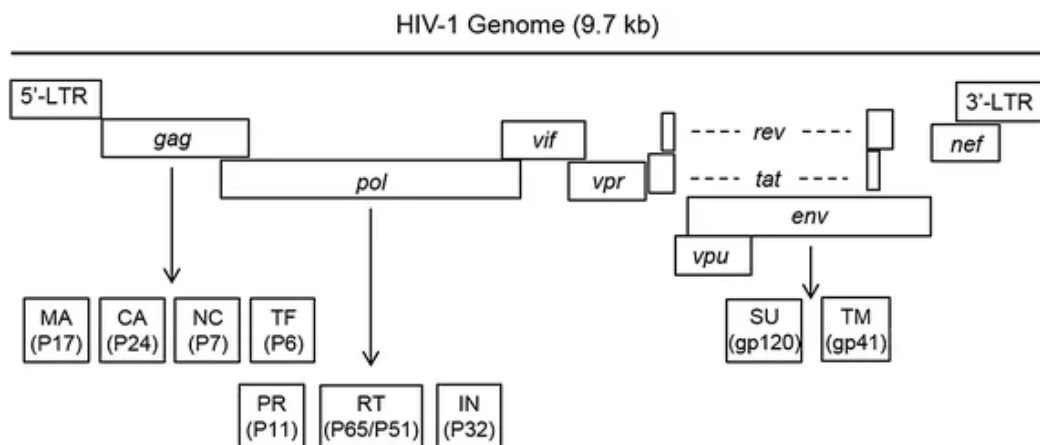


Figura 4. Genoma di HIV e proteine corrispondenti ai geni *gag*, *pol* ed *env* (6)

2.2.1 Geni strutturali

Come tutti i retrovirus il genoma di HIV possiede tre geni strutturali (Figura 5) essenziali per la replicazione, denominati ***gag*** (*group-specific antigen*), ***pol*** (*polymerase*) ed ***env*** (*envelope*) ed organizzati nell'ordine 5'-gag-pol-env-3'.

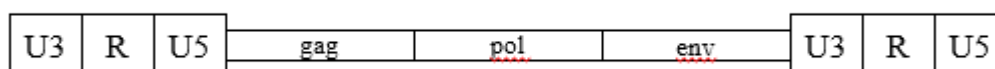


Figura 5. Organizzazione dei geni strutturali di HIV.

Questi 3 geni strutturali vengono tradotti in poliproteine che sono poi scisse nelle proteine funzionali definitive.

Il **gene *gag*** rappresenta la prima ORF del genoma di HIV-1 che codifica per un peptide di 55 Kd, tradotto da mRNA che non va incontro a processi di splicing. Il precursore proteico di questo gene, il polipeptide **p55**, a sua volta viene scisso attraverso meccanismi di proteolisi in tre proteine strutturali: **p24** che rappresenta il principale costituente del capsido, la proteina di matrice **p17** e la **p15** da cui derivano **p7** e **p6** che possono stabilire legami con l'RNA.

Il **gene *pol*** si sovrappone di circa 241 bp al gene *gag* e viene espresso come una proteina di fusione *gag/pol* da un trascritto unspliced lungo quanto il genoma e dalla sua segmentazione si originano le tre proteine enzimatiche: la trascrittasi inversa/ribonucleasi H (**p51** e **p66**), la proteasi (**p10**) ed un'endonucleasi-integrasi (**p32**).

Il **gene *env*** codifica per un precursore altamente glicosilato, la **gp160**: una proteina di 850 aminoacidi che viene scissa in due glicoproteine a più basso peso molecolare: la proteina **gp120** (che si posiziona sull'envelope virale) e la

proteina **gp41** (trans-membrana). Nella forma matura la glicoproteina di env è un eterodimero in cui le due glicoproteine sono tenute insieme da legami non covalenti costituendo, quindi, l'antigene di superficie di HIV-1 che svolge un ruolo di mediazione per l'ingresso del virus nella cellula ospite.

2.2.2 Geni regolatori

I geni regolatori principali *tat* (*Trans Activator of Transcription*) e *rev* (*Regulator of Virion Expression*) controllano l'espressione dei geni virali a livello trascrizionale e post-trascrizionale e sono il risultato della traduzione di mRNA originati da doppi eventi di splicing.

Il primo esone codificante di *tat* è localizzato nella regione centrale del genoma virale tra il gene *vpr* ed *env*, mentre il secondo esone si sovrappone alla cornice di lettura (ORF) di *rev* e della gp41 di *env*.

Il gene *tat* codifica per una proteina di 14 kDa, costituita da 86 aminoacidi. Una volta sintetizzata, *Tat* rientra nel nucleo cellulare ed agisce da attivatore della trascrizione del genoma provirale aumentando l'efficienza dell'RNA Polimerasi II cellulare.

Il gene *rev* codifica per una proteina di 19 kDa, è costituita da 116 aminoacidi ed è coinvolta nel trasporto nucleocitoplasmatico degli RNA virali. Agisce in trans legandosi a regioni ben definite dell'RNA trascritto e rimane localizzato nel nucleo della cellula infetta. Si lega alla regione **RRE** (*Rev Responsive Element*) e promuove l'esportazione nucleare di mRNA non divisi. Una volta prodotta, la proteina rientra nel nucleo per esercitare la sua funzione di trasporto degli RNA.

2.2.3 Geni accessori

I geni accessori di HIV-1 sono *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*. Le proteine di questi geni sono tradotte per lo più da trascritti singly-spliced.

Il **gene *nef* (*Negative Expression Regulatory Factor*)** è situato all'estremità 3' di *env* fino all'interno del dominio U3 della 3' LTR ed è altamente conservato in tutti i lentivirus dei primati. Codifica per una fosfoproteina miristilata di 205 aminoacidi che gioca un ruolo cruciale nella replicazione virale e nella patogenesi, infatti è stato osservato come la perdita della sua funzione porti ad una bassa carica virale e una ritardata (o assente) progressione verso AIDS.

Questa proteina agisce dopo l'ingresso del virus nella cellula e prima che la RT abbia completato il processo di retrotrascrizione: ciò indica che probabilmente interagisce con un componente interno del core di HIV-1 e facilita le prime fasi dell'infezione. Essa è poi incorporata nelle particelle virali mature ed è tagliata da una proteasi virale. Inoltre, agisce riducendo la presenza dei recettori CD4 sulla superficie cellulare mediante endocitosi e down-regolando l'espressione di molecole MHC-1 per proteggere la cellula infettata dal riconoscimento dei linfociti T citotossici. Blocca anche l'apoptosi, aumenta l'infettività e altera lo stato di attivazione cellulare.

Il **gene *vif* (*Viral Infectivity Factor*)** codifica per una proteina basica di 23 kDa tardivamente espressa durante il ciclo replicativo e localizzata nel citoplasma. La presenza di questa proteina è essenziale sia per permettere la replicazione virale nelle cellule infettate che per mantenere l'infettività e la stabilità del core virale.

Il **gene *vpr* (*Viral Protein R*)** codifica per una proteina regolatoria di 15 kDa che si trova nelle particelle virali mature. Essa interviene nella replicazione virale e nella patogenesi durante i primi stadi dell'infezione: trasporta nel

nucleo il DNA virale retrotrascritto. Promuove anche l'arresto del ciclo cellulare in G2 e favorisce l'infezione dei macrofagi e monociti. Oltre all'importazione del DNA virale nel nucleo, *vpr* promuove anche il suo rientro nel citoplasma per poter poi essere incorporato all'interno delle particelle virali in formazione.

Il gene *vpu* (*Viral Protein U*) codifica per una proteina di 17 kDa che forma canali ionici all'interno del rivestimento lipidico e permette l'aumento della permeabilità della membrana plasmatica. Svolge principalmente due funzioni: induce la degradazione dei recettori CD4 (portando ad un aumento del rilascio di particelle virali mature), e contribuisce direttamente all'induzione dell'apoptosi nelle cellule T CD4⁺ infettate. Vpu è assente in HIV-2, dove invece è presente la proteina *Vpx* che sembra avere un ruolo nell'importazione nucleare.

3. CICLO REPLICATIVO

Il ciclo replicativo di HIV-1 è complesso (Figura 6), con una durata e una produzione virale che dipendono dal tipo di target cellulare e dall'attivazione cellulare. Si divide in:

- **Fase precoce:** inizia con il legame del virione al recettore cellulare CD4 e allo specifico corecettore, si ha poi la fusione dell'*envelope* con la membrana plasmatica della cellula ospite e con il conseguente ingresso del genoma di HIV nel citoplasma della cellula. Successivamente l'azione della trascrittasi inversa converte l'RNA virale in DNA che è mantenuto associato a proteine e trasportato all'interno del nucleo della

cellula infettata per l'integrazione nel DNA cellulare; in questo modo il provirus integrato diventa quindi una parte stabile del genoma cellulare.

- **Fase tardiva:** inizia con la trascrizione e il processamento dell'RNA virale derivato dalla forma provirale. Il DNA è trascritto in mRNA e poi in RNA genomico virale. Il virione gemma sulla superficie cellulare arrivando a maturazione. Il processo termina con il rilascio di nuovi virioni dalla cellula.

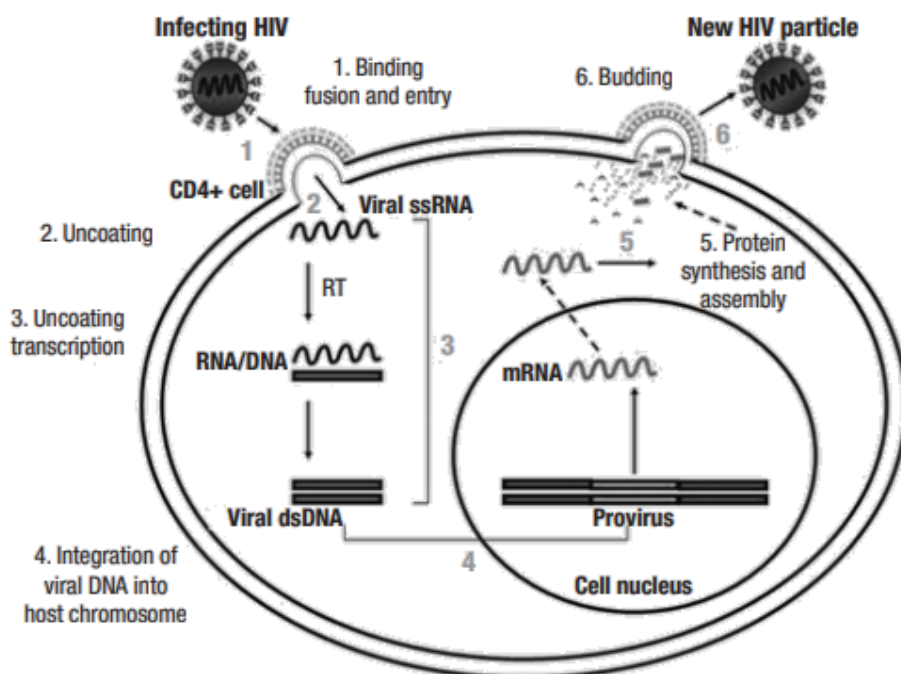


Figura 6. Replicazione del virus HIV (5).

Il virus dell'HIV è in grado di infettare diverse tipologie di cellule ma presenta un tropismo, soprattutto, per cellule che esprimono il recettore CD4 (cellule CD4⁺), come ad esempio linfociti T *helper*, monociti e macrofagi. Per permettere un'efficiente infezione il legame con il solo recettore non è sufficiente. Infatti, mentre il recettore CD4 è richiesto per il legame con la

gp120, co-recettori per le chemochine sono richiesti per la fusione tra l'envelope virale e la membrana della cellula ospite. I due co-recettori più rilevanti sono **CCR5** e **CXCR4**.

Essi sono rappresentati da diverse molecole con sette domini transmembrana che legano una serie di citochine. In particolare, CCR5 è il recettore per le chemochine MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES; mentre CXCR4 è il recettore per il fattore SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*).

Gli isolati di HIV-1 sono stati classificati in base al tropismo in linfociti T-tropici (**T-tropici** o **X4-tropici**) che utilizzano il corecettore CXCR4 e monociti/macrofagi-tropici (**M-tropici** o **R5-tropici**) che utilizzano il corecettore CCR5; inoltre l'utilizzo del CCR5 è associato al fenotipo **NSI** (*non syncytium inducing*), mentre il CXCR4 è associato al fenotipo **SI** (*syncytium inducing*) che riflette la capacità di indurre sincizi in linee cellulari come la linea MT2.

Esistono anche virus *dual-tropici* (**R5X4**) che possono utilizzare entrambi i co-recettori.

La porzione altamente conservata (*bridging sheet*) della proteina virale dell'envelope (gp120) lega il corecettore (Figura 7) ma sono la carica e la conformazione del loop V3 a determinare il diverso tipo di recettore chemiochinico utilizzato. I virus X4-tropici legano il corecettore CXCR4 attraverso forze elettrostatiche: V3 ha una notevole carica positiva che gli permette di interagire fortemente con la porzione acida extracellulare del CXCR4 e con molecole anioniche come l'HSPG (*heparan sulphate proteoglycans*). L'attacco dei ceppi R5 è molto meno influenzato da HPSG, rispetto ai ceppi X4 a causa della debole basicità del loop V3 della gp120 che varia generalmente tra +2, +5, contro +7 e +9 nei ceppi X4 (7).

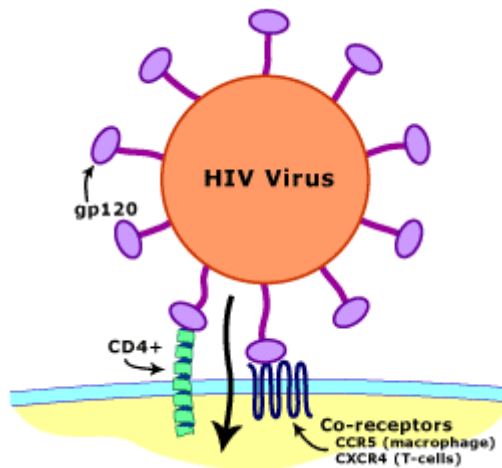


Figura 7. Fase iniziale dell'infezione: legame della particella virale con recettore e corecettore cellulare.

3.1 Adsorbimento e replicazione

Il ciclo replicativo inizia con il riconoscimento, da parte del virione maturo, delle cellule target, *i.e.* quelle che esprimono il recettore CD4 sulla loro superficie (Figura 8).

Inizialmente si ha il legame tra la glicoproteina virale gp120 e il recettore cellulare che determina delle modificazioni conformazionali della glicoproteina virale di superficie capaci di portare all'esposizione degli epitopi antigenici (*bridging sheet*) riconosciuti dai corecettori, e regioni della gp120 vicino a questi epitopi sono responsabili per il legame con essi.

La formazione del complesso CD4/gp120/corecettore sembra provocare ulteriori cambiamenti conformazionali nella gp120 che inducono anche l'esposizione del peptide di fusione presente all'estremità aminoterminale della gp41 e la sua inserzione nella membrana della cellula target. Questi eventi determineranno la fusione delle membrane lipidiche virali e cellulari e quindi

permetteranno al core del virus di essere trasportato nel citoplasma della cellula ospite. Successivamente avviene lo scapsidamento e la liberazione del genoma virale.

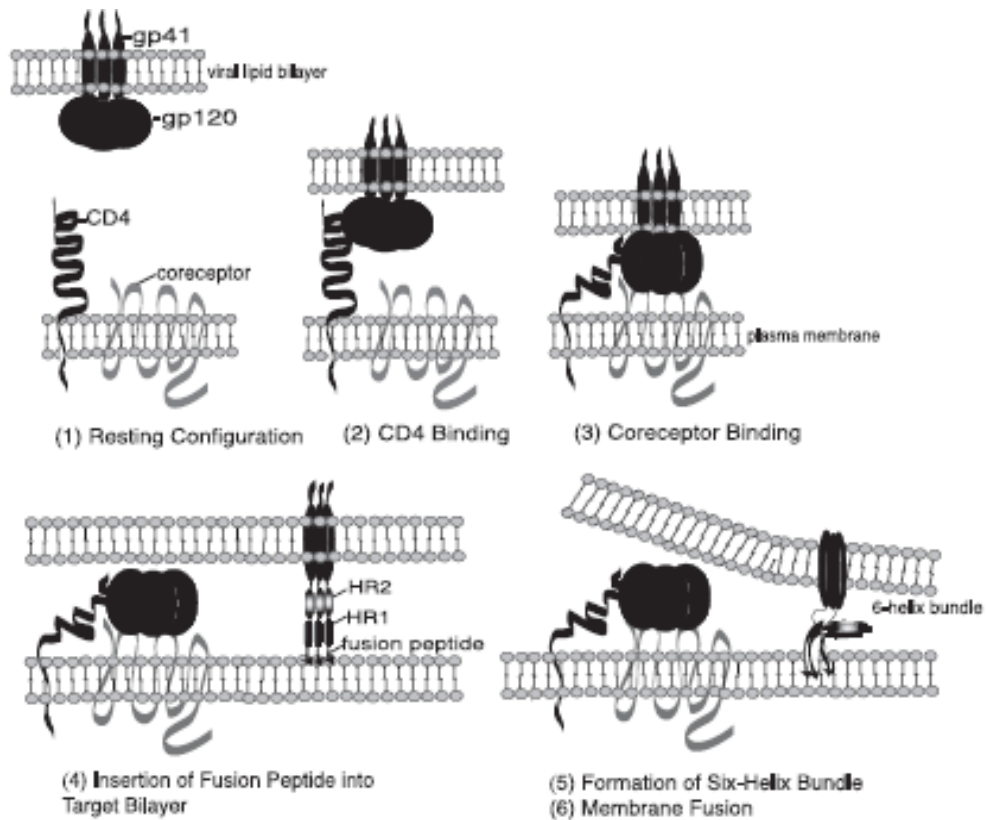


Figura 8. Fase iniziale della replicazione (1).

3.2 Trascrizione del genoma virale

Il genoma retrovirale è composto da due filamenti di RNA, ma sembra che solo uno di essi possa generare il provirus.

Viene prima sintetizzato il filamento di DNA a polarità negativa, e ciò inizia con l'annealing di una molecola di tRNA specifica per la lisina (tRNA^{Lys}) al sito PBS (*Primer Binding Site*) dell'RNA stampo. La retrotrascrizione viene svolta dalla trascrittasi inversa o DNA-polimerasi-RNA dipendente. Il prodotto di trascrizione è una molecola bcatenaria ibrida costituita dalla catena di RNA originale e dalla catena complementare di DNA.

Mentre il filamento di RNA viene degradato ad opera dell'attività ribonucleasica della RT (RNasi H), la catena di DNA viene trascritta dalla RT che utilizza la sua attività di DNA-polimerasi-DNA-dipendente, utilizzando come stampo quella già esistente.

La molecola di dsDNA così ottenuta possiede le sequenze LTR alle estremità (risultando più lunga dell'RNA genomico) e va a formare il **complesso di preintegrazione (PIC)** con gli enzimi integrasi, p17 e la vpr.

Tale complesso viene trasportato nel nucleo per essere integrato nel genoma della cellula ospite e tale trasporto viene regolato dalle proteine virali.

3.3 Integrazione del DNA

Un'importante fase del ciclo replicativo di HIV è l'integrazione del DNA virale retrotrascritto nel genoma della cellula ospite. L'integrasi (IN) è l'enzima virale che gioca un ruolo fondamentale in questa reazione e risulta altamente conservato tra gli isolati clinici di HIV-1.

L'integrazione è un processo fondamentale per un'infezione stabile e produttiva dato che, una volta integrato, il genoma virale resta in maniera permanente come provirus all'interno del genoma della cellula ospite comportandosi come un normale gene umano.

Questa fase del ciclo replicativo è assolutamente indispensabile per HIV poiché il DNA virale non è in grado di replicarsi autonomamente come episoma e deve utilizzare l'apparato di trascrizione cellulare per potersi replicare; inoltre l'integrazione stabile nel genoma dell'ospite protegge il DNA del virus dalla degradazione da parte di enzimi cellulari.

Essa avviene in 2 fasi catalizzate dall'IN: nella prima l'enzima si lega ad una specifica sequenza nelle LTR del DNA virale, portando ad una perdita di due nucleotidi terminali dall'estremità 3' del DNA virale a doppia catena. Successivamente le estremità del DNA processato sono inserite nel DNA dell'ospite ad opera dell'IN. Il processo viene completato mediante l'intervento di enzimi di riparo del DNA di origine cellulare che permettono il riempimento degli spazi creati durante il processo di integrazione, al termine del quale il provirus si trova inserito nel DNA cellulare ed è affiancato alle due estremità dalle sequenze uguali LTR (Figura 9).

Inoltre, è stato osservato che HIV-1 si inserisce preferenzialmente all'interno o vicino a due classi di elementi ripetuti di DNA nel genoma umano, L1 e Alu, elementi trasponibili con proprietà comuni ai retrovirus (8).

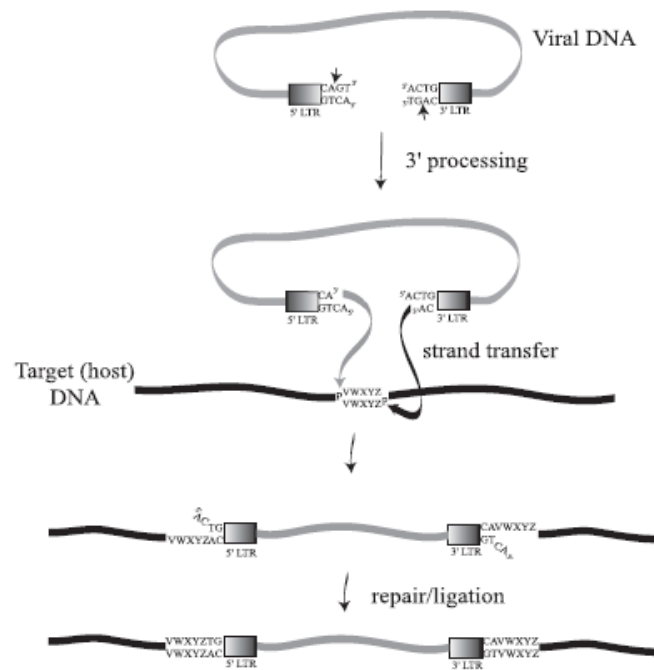


Figura 9. Processo di integrazione del DNA provirale (1).

3.4 Espressione e regolazione di geni virali

Il controllo della sintesi del genoma è complesso e la trascrizione degli RNA messaggeri di HIV viene regolata attraverso una complessa interazione tra LTR, fattori di trascrizione cellulari e proteine regolatrici virali. I primi geni ad essere trascritti sono *Tat*, *Rev* e *Nef*, che codificano per **proteine** definite **precoci**, e vengono trascritti per primi a causa della loro funzione regolatrice nel ciclo cellulare. Mentre *gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr* e *vpu* codificano per proteine definite **tardive**.

Inizialmente in assenza del transattivatore *tat*, il livello di trascrizione specifica virale è basso. Gli RNA precursori vengono trasportati con un meccanismo di trasporto rev-dipendente, ma prima del trasporto gli spliceosomi eliminano gli

introni dai trascritti *multiply-spliced* che vengono tradotti per produrre le proteine regolatorie *tat*, *rev* e *nef* che ritornano al nucleo. Con il procedere della trascrizione i livelli di *tat* aumentano e di conseguenza aumenta l'attività trascrizionale stessa. Man mano che anche *rev* si accumula, gli RNA precursori vengono trasportati al citoplasma mediante un meccanismo *rev*-dipendente che non prevede lo splicing prima del trasporto. In questa fase vengono tradotti nel citoplasma mRNA virali *unspliced* e *singly-spliced* per le proteine tardive. *Rev*, quindi, agisce come un *chaperone* molecolare interagendo con la sequenza RRE presente in tutti i trascritti in corrispondenza del gene *env*.

3.5 Assemblaggio e liberazione del virus

Tutte le proteine strutturali dopo la sintesi migrano verso la periferia della cellula, dove saranno impiegate per l'assemblaggio dei virioni.

Il primo evento è l'interazione tra il polipeptide precursore del gene *gag* (Pr55), il polipeptide precursore Gag-Pol (Pr160) ed il genoma virale per produrre un complesso nucleoproteico. La maturazione delle poliproteine *gag* durante l'assemblaggio è mediata dal dominio della proteasi nella Pr160 per produrre un nucleocapside maturo.

La *gp160*, codificata dal gene *env*, viene glicosilata nel reticolo endoplasmatico e attraverso un sistema di vescicole viene trasportata alla membrana cellulare per l'assemblaggio. Da essa, grazie ad un taglio proteolitico, si origineranno le due glicoproteine *gp120* e *gp41*.

L'*RNA virale* interagisce con una regione del precursore delle proteine del capsido. Quest'ultimo viene quindi assemblato in prossimità del lato interno di

una porzione della membrana cellulare modificata per l'inserzione del complesso gp41-gp120. In questa fase sono coinvolte le proteine *vif* e *vpu*.

La fase di **maturazione** prevede il rilascio delle particelle virali per gemmazione dalla membrana cellulare. Contemporaneamente, o dopo la liberazione dei virioni, interviene la proteasi che scinde le poliproteine gag/pol per dare origine a proteine strutturali ed enzimi indipendenti.

4. PATOGENESI E STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE

Il virus dell'immunodeficienza umana riconosce come cellule bersaglio i linfociti T, i macrofagi e le cellule dendritiche e replica con maggiore efficacia soprattutto quando il sistema immunitario è attivo. Quindi, paradossalmente, la risposta immunitaria fisiologica degli individui, che si verifica in risposta al virus, fa aggravare ancora di più la replicazione virale esponendo il paziente stesso a più cicli di riattivazione e ad una distruzione di un numero maggiore di cellule del sistema immunitario.

Le **vie di trasmissione** (Figura 10 A) possono essere molteplici e includono:

- via *ematica*: trasfusioni di sangue infetto, utilizzo di emoderivati infetti;
- via *sessuale*: HIV può essere isolato sia nel liquido seminale, sia nelle secrezioni genitali femminili. Inoltre, la presenza di lesioni su cute e mucose

delle vie genitali richiama linfociti e monociti che facilitano la possibilità di contagio con HIV-1;

- Inoculazione *parenterale*: il virus va direttamente in circolazione attraverso, ad esempio, l'utilizzo di aghi o di altri oggetti taglienti infetti;
- Trasmissione *verticale*, durante la gravidanza (attraverso la placenta), al momento del parto e durante l'allattamento. Il rischio di trasmissione dell'infezione dipende dalle condizioni cliniche generali della madre, come la carica virale e il numero dei CD4⁺.

Contatti personali non sessuali, come l'esposizione a saliva, urine e a punture di insetto non costituiscono un fattore di rischio nella trasmissione di HIV-1 (Figura 10 B).



Figura 10. Vie di trasmissione del virus HIV (A) e come il virus non viene trasmesso (B).

L'infezione di nuove cellule nel sangue e la disseminazione nell'organismo avviene attraverso il virus libero o per interazione cellula-cellula. I maggiori bersagli di HIV-1 sono il sistema linforeticolare, ematopoietico ed il sistema nervoso. Le cellule bersaglio critiche per l'immunopatogenesi sono le cellule dendritiche, i linfociti T CD4⁺ ed i monociti-macrofagi, pertanto l'infezione è in grado di determinare disordini immunologici.

Nonostante ciò, gli individui infettati sviluppano una risposta umorale e cellulare contro gli antigeni associati ad HIV-1. Anticorpi neutralizzanti sono prodotti dalla maggior parte degli individui ed è stata osservata una correlazione tra la progressione della malattia e i bassi titoli di anticorpi neutralizzanti (9).

4.1 Manifestazioni cliniche

L'infezione da HIV è caratterizzata da tre fasi (figura 11):

- 1) **Infezione primaria:** è caratterizzata da un'incubazione che varia dalle 3 alle 6 settimane. Può essere asintomatica, ma generalmente si ha una sintomatologia acuta (simil-influenzale) con febbre, cefalea, mialgia, diarrea, ecc che si risolve in circa 14 giorni. Il più comune sintomo neurologico è rappresentato da meningoencefalite asettica che riflette il neurotropismo associato a questo virus. Frequentemente si manifesta anche una linfadenopatia e marcati cambi nella conta dei linfociti con un rapporto CD4:CD8 rovesciato (<1) a causa di un calo delle cellule CD4⁺ e aumento delle CD8⁺. Durante questa fase, inoltre si riscontrano alti livelli di virus nel sangue, con un picco di viremia tra 10⁶ e 10⁷ copie/ml nel plasma. In poche settimane una forte risposta immunitaria,

soprattutto cellulo-mediata, riduce i livelli degli indici virali, e parallelamente si osserva un recupero parziale, a volte totale, dei linfociti T CD4⁺.

2) **Fase di latenza clinica:** l'inizio di questa fase corrisponde ad una notevole riduzione della viremia come conseguenza della risposta immunitaria. Tuttavia, l'assenza di manifestazioni sintomatiche non corrisponde ad un'assenza del virus. Infatti, esso viene sequestrato nei linfonodi, dove rimane attivo e continua a replicare, permettendo la liberazione di particelle virali. La durata di questa fase è variabile, può durare anche una decina d'anni, ed è legata alla gravità dell'infezione primaria, alle caratteristiche fenotipiche del virus infettante e allo stato immunologico dell'ospite. Durante questo periodo è opportuno monitorare il numero dei linfociti T CD4⁺ e la carica virale nel plasma, poiché questi due valori, insieme, rappresentano il più accurato metodo per la determinazione della prognosi del paziente.

3) **AIDS conclamato:** la diminuzione del numero dei linfociti T CD4⁺ e l'aumento della viremia portano ad una ricomparsa dei sintomi, come febbre cronica, diarrea, perdita di peso, insorgenza di infezioni opportunistiche e neoplasie, con un generale deterioramento clinico. Una volta accertata la diagnosi di AIDS conclamato, la sopravvivenza spesso è inferiore ai 2 anni, anche se oggi può essere notevolmente aumentata grazie alla terapia.

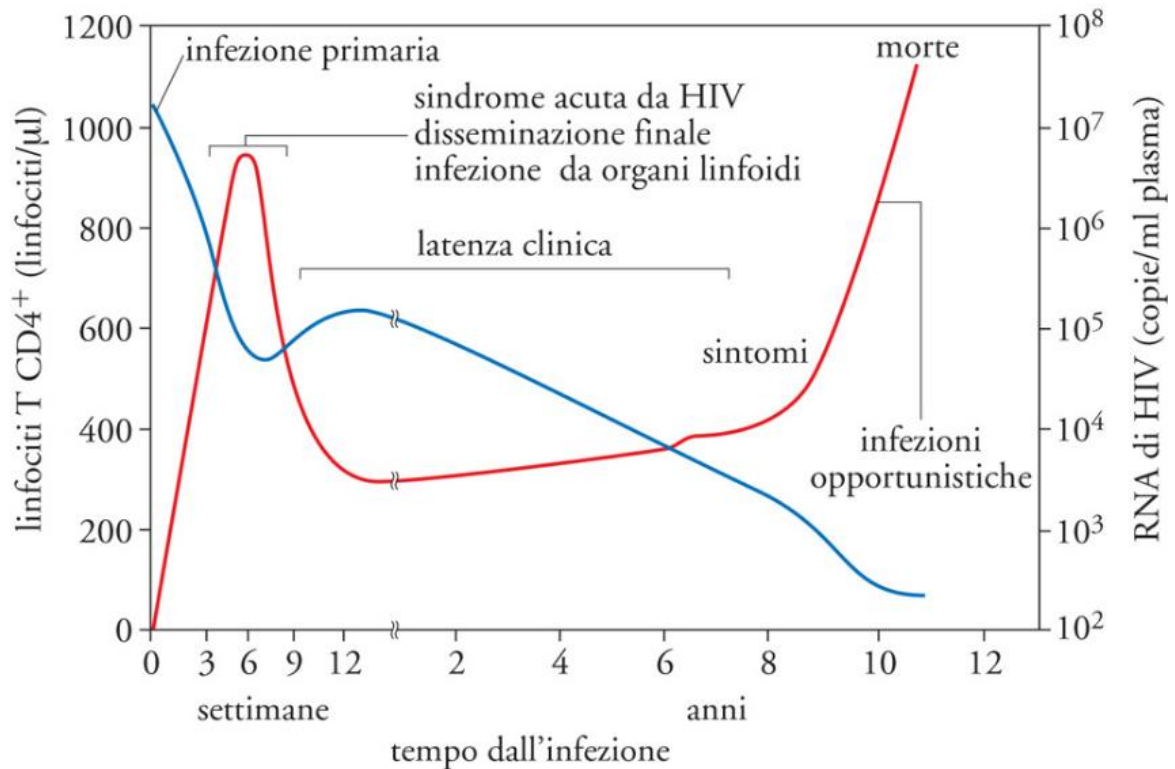


Figura 11. Patogenesi dell'HIV (10).

4.2 Diagnosi di laboratorio

La diagnosi dell'infezione da HIV-1 o HIV-2 può essere effettuata utilizzando diverse metodiche: per lo screening iniziale, tra i saggi sierologici, viene molto utilizzato il *test ELISA*. Solitamente se il risultato è positivo, il test viene nuovamente ripetuto per poi proseguire con un'ulteriore conferma mediante un test biochimico, il *Western blot*.

In alcuni casi è possibile *ricercare l'antigene p24* circolante, infatti nelle primissime settimane d'infezione esso è presente all'interno del siero prima che possano essere rilevati gli anticorpi. Appena questi ultimi compaiono, l'antigene p24 diventa non rilevabile e la sua ricomparsa nel corso dell'infezione di solito indica una prognosi non buona.

Per la *ricerca di anticorpi specifici* per HIV-1 sono stati sviluppati anche test rapidi, facili da eseguire che permettono di ottenere una risposta in circa 20 minuti e possono essere effettuati su plasma, siero, sangue intero o saliva.

HIV, può essere ricercato nei leucociti (linfociti o monociti) del sangue periferico, nelle secrezioni genitali o nel plasma.

Per il monitoraggio del paziente con infezione da HIV-1, i parametri che solitamente vengono controllati sono la **viremia**, cioè il numero di copie di HIV-RNA per ml di plasma, e la **conta delle cellule T CD4⁺**.

5. TERAPIA E CONTROLLO

L'introduzione di potenti terapie antiretrovirali combinate ha avuto una grande influenza sul corso dell'infezione da HIV-1 cambiando, profondamente, l'approccio al trattamento dell'HIV (11) e riducendo notevolmente le morbidità e la mortalità associate all'HIV/AIDS (12). Studiando il virus sia da un punto di vista strutturale che funzionale, i ricercatori hanno osservato diversi “punti critici” nel suo ciclo replicativo e di conseguenza hanno elaborato diverse classi di farmaci.

La Food and Drug Administration americana (FDA) ha approvato 27 singoli farmaci antiretrovirali, suddivisi in 6 classi:

- Inibitori nucleosidici/nucleotidici della trascrittasi inversa (NRTI/NtRTI)
- Inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI)
- Inibitori della proteasi (PI)
- Inibitori della fusione (Enfuvirtide)
- Inibitori dell'entrata (antagonisti del CCR5, per esempio il Maraviroc)

- Inibitori dell'integrasi (Raltegravir, Dolutegravir ed Elvitegravir).

In particolare, gli inibitori della trascrittasi inversa inibiscono la replicazione del genoma virale e gli inibitori della proteasi inibiscono la maturazione del virione, permettendo il rilascio di particelle virali non infettanti.

Inizialmente, veniva praticata la *monoterapia*, che prevedeva l'uso di una singola classe di inibitori, ma a causa dell'elevata velocità di replicazione del virus e della grande variabilità virale, questo approccio, nel corso degli anni, ha portato alla comparsa di ceppi farmaco-resistenti. Successivamente, è stata approvata la *terapia antiretrovirale altamente attiva* (detta **HAART** da Highly Active Anti-Retroviral Treatment) che consiste nell'utilizzo di tre o più farmaci appartenenti a due o più classi di inibitori e sopprime la replicazione virale a così bassi livelli che la comparsa di varianti di HIV farmaco-resistenti viene ritardata per molti anni. Questo tipo di trattamento ha permesso così di diminuire le morbidità e la mortalità dovute all'infezione, trasformando la patologia da una sentenza di morte a una *malattia cronica a lunga decorrenza*. Malgrado la sua efficacia, la terapia antiretrovirale tende a selezionare varianti resistenti abbastanza frequentemente a causa di un basso controllo della replicazione virale o a causa di una scarsa aderenza alla terapia da parte del paziente. Pertanto, occorre creare nuovi composti e nuove strategie terapeutiche per contrastare la comparsa di ulteriori resistenze, dovute alla grande variabilità di questo virus che porta alla formazione delle quasispecie virali, soprattutto in individui cronicamente infetti.

6. IL DNA PROVIRALE DI HIV

Una delle caratteristiche peculiari di HIV è la capacità del virus di integrare il proprio genoma in quello della cellula ospite (13), portando alla formazione di un serbatoio virale in grado di riprendere la replicazione ogni volta che l'efficacia della terapia risulti subottimale. La presenza di un reservoir sempre disponibile costituisce, di fatto, un ostacolo enorme per la messa in atto di strategie di eradicazione del virus (14). Infatti, malgrado l'efficacia della terapia antiretrovirale, il virus non viene mai eradicato completamente e il DNA provirale dell'HIV può persistere integrato nel genoma della cellula ospite per sempre (15).

Per tali motivi la quantificazione di HIV-DNA può essere considerata come un marker di progressione della malattia verso lo sviluppo dell'AIDS o verso la morte (16, 17). Sono state proposte diverse strategie terapeutiche per cercare di indebolire tale reservoir. Una di queste potrebbe essere l'approccio “shock and kill” (12), che consiste nell'utilizzare un agente farmacologico per provocare uno “shock” al provirus integrato all'interno della cellula ed attivare, quindi, la sua attività trascrizionale, permettendo il suo rilevamento ed eliminazione tramite meccanismi immunitari o terapeutici.

Un'altra strategia è stata testata utilizzando il meccanismo “Lock and Block”, in cui viene bloccata la capacità del virus di ri-emergere del tutto dallo stato di latenza e diffondere l'infezione ad altre cellule. In alternativa, un approccio più aggressivo coinvolgerebbe un editing genomico per compromettere la capacità del provirus di generare un'ulteriore infezione o per rimuoverne interamente il suo genoma (18).

Provirus competenti per la replicazione sono presenti in cellule infette che sono entrate in latenza (19), in cellule che mantengono una bassa replicazione virale

e promuovono una disseminazione dell'infezione di tipo cellula-cellula (20) ma anche in distretti tissutali dove i farmaci non riescono a penetrare, generando una viremia "residua" (es. SNC e tessuto linfoide associato all'intestino) (21, 22).

Nello specifico i **reservoir cellulari** sono rappresentati da (23):

- *Cellule T CD4⁺*: l'HIV infetta principalmente le cellule del sistema immunitario e in particolare le cellule T CD4⁺ che rimangono il reservoir meglio caratterizzato soprattutto in pazienti con soppressione virale sopposti a terapia. Allo stato naïve, dopo essere state prodotte dal midollo osseo, le cellule T si dirigono verso il timo, dove subiscono una selezione antigenica. In presenza di uno stimolo adeguato, proliferano e differenziano in cellule effettrici attive e specializzate, come ad esempio le cellule T Helper (Th1, Th2, Th9 e Th17), cellule Th follicolari e cellule T regolatorie. Queste cellule differenziate rappresentano il principale target dell'infezione di HIV-1. Tuttavia, hanno una durata piuttosto breve a causa dell'effetto citopatico del virus e dell'attività citotossica del sistema immunitario. Alcune di esse entrano in uno stato di latenza convertendosi in cellule a lunga vita, *i.e.* cellule *T della memoria*, garantendo la permanenza del provirus e il mantenimento a lungo termine del reservoir virale. Studi hanno dimostrato che distinti sottogruppi di cellule T della memoria possono essere infettati in misura diversa dall'HIV-1 supportando in maniera differente la persistenza virale. Di particolare interesse risultano le cellule T CD4⁺ della memoria centrale che sono considerate il reservoir più importante dell'HIV latente;
- *Cellule mieloidi*: tra cui troviamo i macrofagi, sono un target cellulare dell'infezione, anche se il loro ruolo nella formazione del reservoir

rimane oggetto di numerosi dibattiti. Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che i macrofagi non vengono eliminati dall'attività citopatica virale, il che li renderebbe dei buoni candidati per la costituzione di un reservoir stabile. Tuttavia, la complessità delle cellule della linea mieloide ha reso difficile lo studio dell'infezione da HIV e la sua latenza al loro interno;

- *Cellule dendritiche*: sono un gruppo eterogeneo di cellule che presentano l'antigene (APC, *antigen presenting cells*), alcune con origine linfoide e altre mieloide, e con caratteristiche diverse in base alla loro posizione anatomica. In particolare, esse sono risultate sensibili all'infezione da HIV *in vitro*, ma *in vivo* la loro capacità di essere infettate dal virus risulta essere inferiore rispetto a quella delle cellule T CD4⁺. Per tale motivo, si pensa che il loro ruolo sia quello di sequestrare i virioni intatti ed esporre l'antigene alle cellule T, infettandole. Inoltre, le cellule dendritiche follicolari sono in grado di trasportare sulla loro superficie un pool stabile di virioni di HIV-1 senza essere infettate;
- *Cellule epiteliali, fibrociti e astrociti*: sembrerebbero implicati nella formazione del reservoir, tuttavia il loro ruolo è ancora oggetto di molti studi.

Per quanto riguarda i **reservoir anatomici**, questi possono essere molteplici: una volta infettato l'ospite, HIV-1 replica in prossimità del sito d'ingresso, nel giro di giorni si diffonde ai linfonodi, e, successivamente (settimane) giunge nel torrente circolatorio per mezzo del quale si diffonde in tutto il corpo. La circolazione sanguigna, infatti, distribuisce le particelle

virali a tutto l'organismo, mediante il trasporto di cellule immunitarie infette e la trasmissione cellula-cellula. I distretti anatomici coinvolti sono rappresentati da *cervello* e liquido cerebrospinale, *polmoni*, *reni*, *fegato*, *tessuto adiposo*, *tratto gastro-intestinale* e *urogenitale* (maschile e femminile) e *midollo osseo*. In particolare, il *tessuto linfoide* risulta essere il più importante sito di replicazione virale durante l'infezione attiva e HIV-DNA può essere rilevato all'interno dei linfonodi anche dopo numerosi anni di terapia antiretrovirale.

È noto come la terapia antiretrovirale altamente attiva sia capace, seppur in tempi molto lunghi, di provocare un decadimento del DNA provirale nei pazienti trattati (24). Inoltre, se la terapia viene assunta tempestivamente nei primi stadi dell'infezione limita la costituzione del reservoir virale, preservando un buono stato immunitario del paziente e, di conseguenza, limitando la trasmissione del virus (25). D'altra parte, è noto che non tutti i provirus sono competenti alla replicazione e quindi in grado di provocare un rebound viremico (26). In effetti, solo il 10% di tutti i provirus di HIV integrati mantiene un genoma intatto, e solo un decimo di essi ha la capacità di riattivarsi (27). Ciò nonostante, anche i provirus che non sono in grado di provocare un rebound viremico hanno un coinvolgimento nella patogenesi, codificando per proteine virali che vengono comunque trascritte dalla cellula ospite.

Alla luce di tutto ciò, la quantificazione del DNA provirale di HIV risulta essere fondamentale nel monitoraggio del paziente infetto (28). Infatti, studi basati sull'eradicazione del virus hanno rivelato la necessità di un dosaggio preciso e sensibile per caratterizzare e monitorare l'estensione del reservoir dell'HIV (12). Inoltre, la valutazione dell'HIV-DNA potrebbe anche essere utilizzata come fattore predittivo del successo della terapia in pazienti naïve, poiché è

stato dimostrato che il carico dell'HIV-DNA è correlato sia alla conta delle cellule CD4⁺ (29) che ai livelli di HIV-RNA plasmatico (29, 30). Per ottenere maggiori informazioni sul ruolo di questo reservoir sono stati sviluppati, nel tempo, numerosi test volti a quantificare HIV-DNA.

In generale, due sono gli approcci molecolari più utilizzati nei saggi di quantificazione: la real-time PCR (qPCR) e la droplet digital PCR (ddPCR).

La qPCR è stata largamente utilizzata (31-38) non solo per la sua relativa semplicità di esecuzione ma anche per la sua sensibilità e specificità nella valutazione della carica provirale in campioni di sangue e tessuti (39) e per guidare possibili strategie di semplificazione della terapia (40). Tuttavia, la qPCR non è in grado di distinguere tra provirus competenti e difettivi (27, 38) poichè misura tutte le forme di HIV-DNA presenti nelle cellule latentemente o produttivamente infettate (38). La ddPCR presenta diversi vantaggi, uno su tutti, il fatto di non necessitare di una curva di calibrazione per l'interpretazione dei risultati. Pertanto, la sua applicazione non dipende dalla disponibilità di calibratori e standard di riferimento appropriati. Risulta, di fatto, una tecnica precisa e sensibile, poichè è in grado di rilevare l'analita anche a concentrazioni molto basse e in presenza di un ampio background genomico di molecole non target, come nel caso della quantificazione di HIV-DNA, tuttavia si basa su una tecnologia nuova ed è ancora molto costosa (41).

In questo scenario, la real-time PCR risulta, ancora, la tecnica più utilizzata nei saggi di quantificazione del DNA provirale di HIV-1.

Ulteriori saggi per la valutazione del DNA provirale sono stati messi a punto con l'intenzione di distinguere le forme provirali di HIV integrate da quelle episomali, sono metodi sperimentali sempre basati su saggi di PCR ed ognuno di essi ha qualche limite che non lo rende adatto alla routine:

- Alu-gag PCR per HIV DNA integrato: questa tecnica utilizza le sequenze Alu come target della real-time PCR per identificare il DNA integrato. Tuttavia, non è in grado di rilevare la capacità del virus di essere riattivato; inoltre risulta essere un saggio poco pratico e non ci sono indicazioni sull'influenza del sito di integrazione sulla capacità di rilevare e quantificare l'HIV-DNA da parte di questo tipo di tecnica (42);
- Quantificazione delle forme circolari a 2-LTR: permette di quantificare il genoma non integrato di HIV. È stato osservato che la presenza di tali forme circolari, la maggior parte delle volte, rappresenta un marker di replicazione in atto, identificando, quindi, cellule recentemente infettate (43), Tuttavia, altri hanno dimostrato che la presenza di queste forme non suggerisce necessariamente una replica in atto (44).

7. RAZIONALE DELLO STUDIO

Negli ultimi anni numerosi studi hanno portato ad una migliore conoscenza del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) e ad un reale controllo dell'infezione e della malattia. In particolare, lo sviluppo di farmaci formulati per essere attivi su diverse fasi del ciclo virale e per essere utilizzati in un'unica somministrazione quotidiana ha consentito una gestione a lungo termine dei pazienti HIV positivi riducendo notevolmente la mortalità associata all'infezione. Tuttavia, nonostante la soppressione dell'HIV-RNA plasmatico a livelli non rilevabili grazie all'efficacia della terapia, il DNA provirale può persistere per anni integrato nel genoma della cellula ospite. Questo serbatoio, rappresentato principalmente dalle cellule T CD4⁺, consente la persistenza dei genomi virali dai quali è possibile una ripresa della replicazione virale in caso di interruzione o fallimento della terapia. Studi sull'eradicazione dell'HIV hanno rivelato la necessità di un test preciso e sensibile per caratterizzare e monitorare l'estensione del serbatoio virale. La misurazione della carica di DNA provirale non solo ha un valore prognostico come marker di progressione della malattia ma potrebbe anche rappresentare un valido strumento per monitorare l'andamento della terapia in pazienti virologicamente soppressi, fornendo informazioni sulla efficacia del regime terapeutico nel ridurre i reservoir cellulari dell'infezione e l'eventuale possibilità di semplificazione. La messa a punto di protocolli volti ad estrarre e quantificare l'HIV-DNA da campioni di sangue intero o da cellule periferiche mononucleate (PBMC), risulta essere un argomento di centrale importanza, pertanto svariati kit commerciali sono stati resi disponibili per la quantificazione del reservoir di HIV-1. Tuttavia, questi test commerciali, di solito, utilizzano metodiche di real-time PCR che lavorano con curve di calibrazione esterne senza considerare

l'effetto esercitato dal processo di estrazione del DNA sulla resa finale per la corretta interpretazione del dato quantitativo. Inoltre, attualmente non esistono metodi standardizzati per la quantificazione del DNA provirale dell'HIV-1, controllati durante l'intero processo, dall'estrazione all'amplificazione.

In questo scenario si inserisce il presente lavoro di tesi che ha lo **scopo** di mettere a punto una metodica di estrazione e amplificazione per HIV-DNA, totalmente validata e controllata, sviluppata modificando un saggio commerciale quantitativo progettato per la quantificazione dell'HIV-RNA. Tale metodica è stata poi applicata per quantificare la carica provirale sia in pazienti naïve, viremici che in pazienti cronicamente trattati con una viremia non rilevabile da almeno 4 anni.

8. MATERIALI E METODI

8.1 Estrazione del DNA

Il DNA provirale di HIV è stato estratto a partire da 300 μ l di campione, sangue intero o PBMCs utilizzando un protocollo in modalità aperta sullo strumento Abbott *m2000sp* (Abbott Laboratories, Illinois, U.S.A.; Figura 12) ed il kit *Abbott mSample Preparation System DNA* (Abbott).

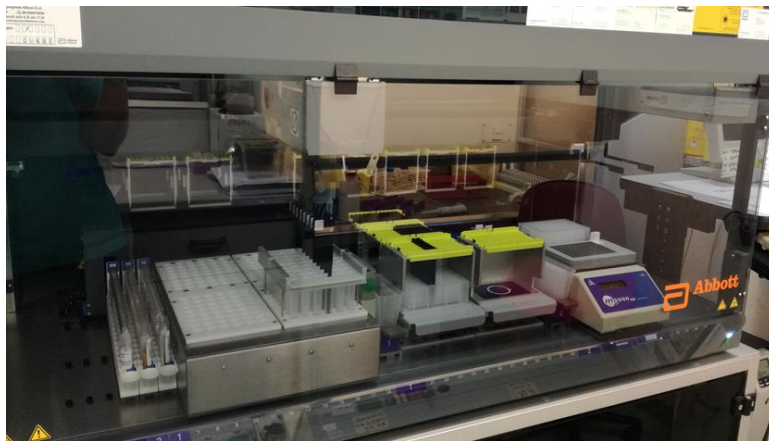


Figura 12. Strumento Abbott *m2000sp*.

Il kit commerciale utilizzato comprendeva i seguenti reagenti: microparticelle magnetiche (*mMicroparticles_{DNA}*), tampone di lisi (*mLysis_{DNA}*), 2 soluzioni di lavaggio (*mWash1_{DNA}* e *mWash2_{DNA}*) e tampone di eluizione (*mElution Buffer_{DNA}*); la Proteinasi K (*Proteinase K Recombinant, PCR grade from Pichia Pastoris, Abbott*) era fornita separatamente e veniva diluita, in acqua. Mentre il Wash1, le microparticelle e il tampone di eluizione venivano caricati a bordo dello strumento tal quali, il Wash2 doveva essere addizionato con 70 ml di etanolo assoluto. Il tampone di lisi (70 ml) veniva completato con 124 μ l di

controllo interno (gene codificante la idrossipiruvato reduttasi della specie *Cucurbita pepo*) presente all'interno del kit *Abbott real-time HBV quantitative reagents* (Abbott) e fornito come DNA plasmidico in soluzione tampone.

La procedura di estrazione si articolava in una serie di fasi consecutive: brevemente, 300 μ l di ciascun campione venivano pescati e dispensati nelle provette di reazione, lo strumento aggiungeva, quindi, la proteinasi K che veniva incubata 10 minuti a 58°C e le microparticelle in grado di legare il DNA che si liberava dopo la rottura delle cellule. In seguito, veniva aggiunto il tampone di lisi ed effettuati diversi lavaggi. Tra un lavaggio e l'altro le provette venivano spostate su un blocco magnetico, per raccogliere le microparticelle (legate al DNA) sul fondo della provetta ed eliminare il sovrnatante. Infine, il DNA veniva eluito aggiungendo 100 μ l del tampone di eluizione che determinava il distacco del DNA dalle microparticelle. Il sovrnatante veniva quindi dispensato all'interno di una piastra a pozzetti fondi e conservato per essere utilizzato nei successivi saggi di amplificazione.

8.2 Amplificazione mediante real-time PCR

Gli estratti di DNA venivano sottoposti a due saggi di real-time PCR entrambi eseguiti utilizzando il termociclatore *7500 Fast Real-time PCR System* (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

I saggi di real-time PCR sono stati eseguiti in accordo con le linee guida disponibili in letteratura (46).

a) Quantificazione dell'HIV-1 DNA

L'HIV-DNA è stato amplificato utilizzando il kit *Abbott real-Time HIV-1 quantitative reagents* (Abbott). Il kit comprendeva tre provette: la prima conteneva un attivatore (*Activation Reagent*), la seconda 4 primers, 2 sonde e i dNTP e la terza boccetta l'enzima (*Thermostable rTth Polymerase Enzyme - 2.9 to 3.5 Units/μl*). La master-mix veniva preparata manualmente aggiungendo alla provetta contenete l'enzima, 271 μl dell'attivatore e 949 μl della soluzione contenente sonde, primers e dNTP.

La piastra per la real-time veniva preparata manualmente, dispensando, in ciascun pozzetto, 15 μl di master mix e 15 μl di estratto, raggiungendo quindi un volume finale di 30 μl. Il profilo termico, mostrato in, è stato impostato in accordo alle istruzioni fornite dal produttore, escludendo solo la fase di trascrizione inversa.

b) Quantificazione dei genomi totali

Il gene codificante la trascrittasi inversa della telomerasi umana (hTERT) è stato utilizzato come gene di riferimento per valutare il numero totale di genomi cellulari presenti nei campioni clinici.

La reazione di real-time PCR veniva condotta in un volume finale di 25 μl contenente: 12.5 μl QExpress Mix (*ThermoFisher Scientific*), 2.25 μl (10 μM) di ciascun primer, 0.5 μl di sonda VIC, 2.5 μl di acqua ultra-pura.

Le sequenze nucleotidiche dei primers e della sonda erano le seguenti (34):

hTERT-S 5'-GGCACACGTGGCTTTTCG-3'

hTERT-AS 5'-GGTGAACCTCGTAAGTTTATGCAA-3'

sonda 5'-VIC-TCAGGACGTCGAGTGGACACGGTG-3'-TAMRA

Le piastre venivano preparate manualmente dispensando 20 µl di mix in ciascun pozzetto della piastra e 5 µl di campione. Il profilo termico utilizzato nella reazione di real-time PCR è mostrato in tabella 1.

Tabella 1. Profilo termico per quantificazione dei genomi totali

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cicli
50	02:00	1
95	10:00	1
95	00:15	45
60	01:00	

Per valutare il numero totale di genomi cellulari presenti negli estratti dei campioni clinici sono state utilizzate delle curve standard, realizzate a partire da estratti di DNA di cellule CEM (linfoblasti; CCRF-CEM cells - ATCC CCL-119) mantenute in coltura (come descritto in seguito). Le curve sono state ottenute diluendo un estratto di partenza per ottenere quattro concentrazioni diluite in ragione di due, da 50000 a 400000 copie/reazione (da qui in poi cp/rct).

8.3 Curva di calibrazione

Sono stati preparati due calibratori a partire da sangue intero ottenuto da pazienti HIV-1 negativi addizionato con pNL4-3mod (47), a due diverse concentrazioni finali (10^3 e 10^5 cp/ml). Entrambi i calibratori, denominati standard uno (std 1 - 10^3 cp/ml) e standard due (std 2 - 10^5 cp/ml), sono stati estratti e amplificati al fine di generare una curva di calibrazione master sulla quale interpretare i dati di ciascuna sessione relativa ai campioni clinici.

8.4 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica della nuova procedura è stata valutata mediante analisi probit che determina il limite di quantificazione e rilevazione (LOQ e LOD, rispettivamente). Il LOQ è definito come la concentrazione più bassa alla quale l'analita può essere quantificato in modo affidabile. Il LOD è la più piccola concentrazione di analita che può essere distinta, in modo affidabile, da zero (48) con un tasso di successo (*hit-rate*) del 50% e 95%. Pertanto, campioni di sangue intero, sieronegativi per HIV sono stati addizionati con pNL4-3mod a diverse concentrazioni finali (1200, 1000, 800, 600, 300, 150, 75, 40 cp/ml), estratti considerando un numero adeguato di replicati per ogni punto (almeno 18 repliche per livello) e amplificati come descritto sopra.

LOQ e LOD sono stati ottenuti anche considerando solo il processo di amplificazione, senza tener conto dell'estrazione, testando diluizioni a raddoppio che andavano da 80 cp/rct a 0,62 cp/rct (almeno 10 replicati per livello).

8.5 Campioni clinici

Sono stati analizzati un totale di 128 campioni, sangue o PBMCs, a seconda della disponibilità, ottenuti da 66 pazienti in terapia antiretrovirale e con la viremia (HIV-RNA plasmatico) non rilevata da almeno 4 anni e da 62 pazienti naïve, mai trattati in precedenza con farmaci antiretrovirali e quindi altamente viremici all'atto dell'arruolamento.

I campioni di sangue intero sono stati prelevati e conservati a -80°C fino all'utilizzo. I PBMCs sono stati separati dal sangue tramite gradiente di densità

utilizzando un terreno di separazione denominato *Lymphocyte Separation Medium* (MP Biomedical, Santa Ana, California). Brevemente, il sangue intero veniva diluito 1:1 con terreno di coltura *RPMI 1640* (Carlo Erba Reagents, DASITGROUP). Successivamente la soluzione di sangue/RPMI veniva stratificata all'interno in una provetta contenente il terreno di separazione. La provetta veniva quindi centrifugata a 1800 rpm per 30' in modo da ottenere, secondo differente gradiente di densità, la separazione tra le cellule del sangue, il plasma e i PBMCs (Figura 13).

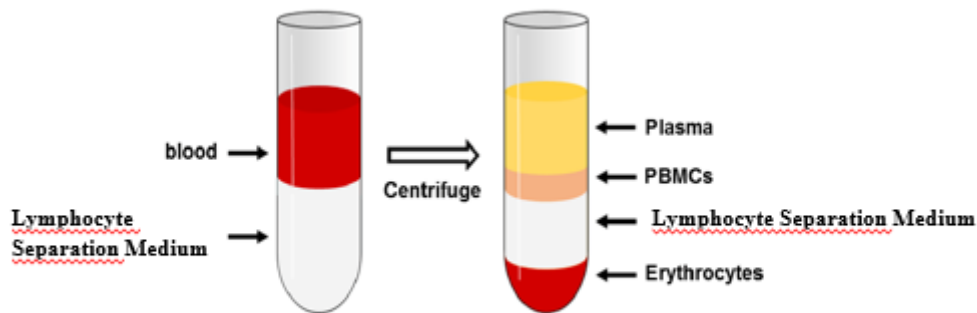


Figura 13. Schema della stratificazione dopo centrifugazione. I PBMCs si trovano nell'anello collocato all'interfaccia plasma/terreno di separazione.

L'anello contenente i PBMCs, situato all'interfaccia plasma/terreno di separazione, veniva prelevato e si effettuava un lavaggio con soluzione fisiologica (3000 rpm per 10'). Il pellet ottenuto era risospeso e nuovamente centrifugato a 5000 rpm per 5'. Il sovrnatante veniva rimosso completamente ed il pellet congelato a -80°C fino al suo utilizzo.

8.6 Colture cellulari per il dosaggio di hTERT

Le linee cellulari stabilizzate offrono il vantaggio di essere una fonte pressoché inesauribile di un materiale di studio abbondante e omogeneo.

Tali linee sono derivate da colture primarie di tumori o da manipolazioni genetiche di colture primarie non tumorali in cui il programma genetico della senescenza è stato annullato. In questo studio è stata utilizzata una linea cellulare (in sospensione) costituita da linfoblasti derivati da leucemia linfoblastica acuta (cellule CEM) da utilizzare come estratti di DNA per la creazione di curve di calibrazione nei saggi di quantificazione dei genomi nei campioni clinici.

• Mantenimento della coltura

Le cellule venivano fatte crescere in fiaschette per colture cellulari a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Il terreno di coltura richiesto per tale linea cellulare era l'*RPMI Medium 1640 (Carlo Erba reagents)*. Tale terreno veniva completato, al momento dell'utilizzo, con l'aggiunta di 1% (v/v) di glutammina stabile (*Thermofisher Scientific*), 1% (v/v) di HEPES (*Thermofisher Scientific*), 10% (v/v) di siero bovino fetale (*EuroClone, Milano, Italia*) e con 100U/ml di penicillina e 100µg/ml di streptomina per preservare la coltura cellulare da contaminazioni batteriche e micotiche.

Per il mantenimento della coltura cellulare si effettuava una espansione ogni 4-5 giorni in modo da mantenere una concentrazione cellulare sempre compresa nel range 2×10^5 - 2×10^6 cellule vitali/ml. A tale scopo, era necessario contare le cellule al microscopio rovesciato (Figura 14) mediante l'utilizzo di una camera di conta (*KOVA GLASSTIC SLIDE 10 WITH GRIDS, KOVA INTERNATIONAL, Garden Grove, CA*).



Figura 14. Microscopio rovesciato con il quale si eseguiva l'osservazione delle cellule tenute in coltura.

Applicando il fattore di conversione della camera di conta (figura 15), si poteva risalire al numero di cellule/ μl e poi cellule/ml per poter effettuare una diluizione della coltura in modo da mantenerla nel range di concentrazione appropriato.

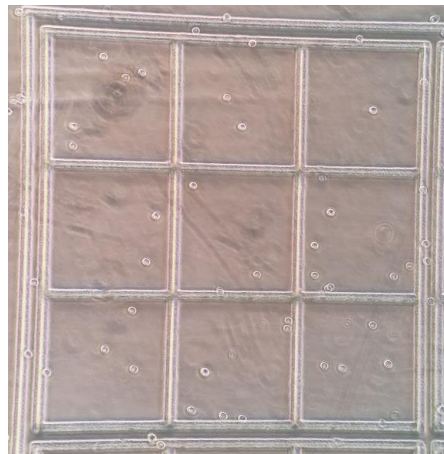


Figura 15. Visuale della camera di conta al microscopio rovesciato (obiettivo 10X) nella quale sono state inoculate le CEM per la conta cellulare.

• **Procedure di congelamento e scongelamento**

Al fine di garantire il mantenimento nel tempo di questa linea cellulare alcune aliquote sono state *congelate e conservate in azoto liquido*.

Una sospensione ad alta densità cellulare (circa 5×10^6 cell/ml) veniva centrifugata a 1200 rpm per 7'. Il pellet ottenuto veniva risospeso in 1 ml di terreno di congelamento e dispensato in provette da 1,8 ml (Cryogenic Vials, Nalgene Company). Il terreno di congelamento era così costituito:

- 50 % di siero bovino fetale
- 10% di DMSO
- 40% di terreno completo

Le provette venivano inizialmente conservate a -80°C overnight in un dispositivo (*NALGENE Cryo 1°C Freezing Container*) contenente isopropanolo che permetteva un lento e graduale congelamento ($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e, in seguito, trasferite in azoto liquido.

Al contrario, lo *scongelamento* doveva essere effettuato rapidamente: una provetta veniva prelevata dall'azoto liquido e messa in bagno a 37°C fino al completo scongelamento. A questo punto venivano aggiunti 6 ml di terreno di coltura completo, per diluire il DMSO e la sospensione veniva centrifugata a 1200 rpm per 8'.

Il pellet veniva poi risospeso in 5 ml di terreno completo, trasferito in fiaschetta e incubato a 37°C e 5% CO_2 .

• **Estrazione DNA**

Per la messa a punto delle curve di calibrazione nei saggi di quantificazione dei genomi cellulari, il DNA dalle cellule in coltura veniva estratto utilizzando

il kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania)* seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

8.8 Analisi statistica

Per analizzare i risultati relativi ai pazienti sono stati applicati due test statistici: *correlazione di Spearman* e il *test-U di Mann Whitney*. Tali test sono stati eseguiti utilizzando il software GraphPad Prism versione 7.00 per Windows (*GraphPad Software, La Jolla California USA*).

9. RISULTATI

Il primo passo nella messa a punto del protocollo standardizzato per la quantificazione della carica provirale di HIV, è consistito nel dosaggio del plasmide pNL4-3mod. Questo è stato possibile utilizzando una curva di calibrazione ottenuta da diluizioni in ragione di 10 (da 10^4 a 10 cp/reaz) di uno standard internazionale certificato denominato *PCR Reference Kit/95 ARP-956 (National Institut for biological standards and controls-NIBSC)*.

Questo ha permesso di avere una quantificazione certa del pNL4-3mod che è stato poi utilizzato in tutti gli esperimenti di messa a punto del metodo e come controllo durante le sedute di estrazione dei campioni clinici.

9.1 Calibrazione del sistema: creazione di una curva di calibrazione master per HIV-1 DNA

I risultati ottenuti dall'estrazione e amplificazione dei due calibratori, std1 (10^3 cp/ml) e std2 (10^5 cp/ml) sono stati utilizzati per generare una curva di calibrazione master da applicare nella quantificazione del DNA provirale di HIV-1 nei campioni dei pazienti.

A questo scopo, testando 42 replicati di ciascun calibratore, sono stati ottenuti valori comparabili dei cicli soglia (Ct) come evidenziato dai coefficienti di variazione (CV) mostrati in Tabella 2.

Tabella 2. Risultati degli esperimenti di calibrazione.

Calibratore	Log ₁₀ (cp/rct)	Ct medio	Dev St	CV (%)
std1	1,65	22,94	±0,66	2,87
std2	3,65	16,46	±0,45	2,73

La curva di calibrazione master è stata poi generata plottando, in un grafico cartesiano, il logaritmo delle cp/rct dei due calibratori, sull'asse x e i rispettivi cicli soglia, sull'asse y (Figura 16).

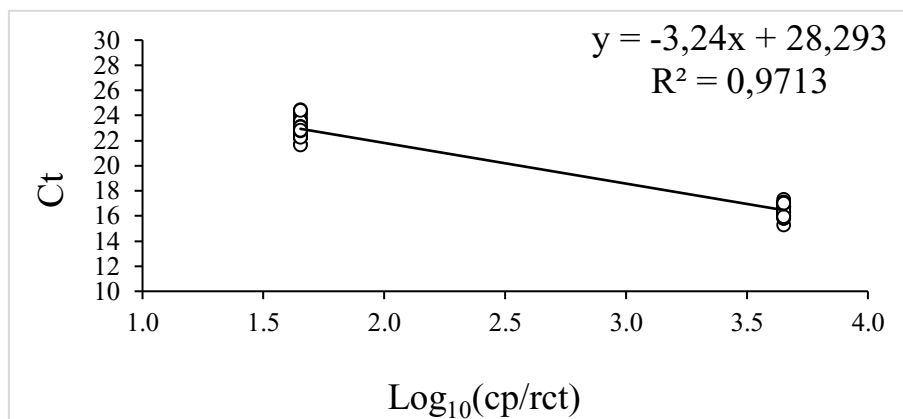


Figura 16. Curva di calibrazione master per HIV-1 DNA ottenuta estraendo e amplificando 42 replicati di ciascun calibratore. Come atteso, i dati mostrano una pendenza negativa.

La pendenza negativa della curva rifletteva la relazione tra la concentrazione del plasmide e il ciclo soglia ottenuto dopo qPCR: al diminuire della concentrazione plasmidica aumentava il valore del ciclo soglia e viceversa, con un coefficiente di determinazione (R^2) pari a 0,9713.

Al fine di valutare la comparabilità di diversi set di diluizione del plasmide e l'influenza di diversi background genomici (matrice di sangue da pazienti diversi) sulle prestazioni dei due calibratori, sono stati testate 10 diluizioni indipendenti di pNL4-3mod che sono state addizionate in campioni di sangue

intero provenienti da 10 diversi donatori sieronegativi per HIV-1. I risultati ottenuti (Tabella 3) erano comparabili per entrambi i calibratori e risultavano sovrapponibili ai cicli soglia e ai coefficienti di variazione ottenuti durante i test per lo sviluppo della curva master.

Tabella 3. Valutazione della variabilità dei calibratori considerando diversi background genomici e differenti set di diluizione del pNL4-3mod.

Calibratore	Log ₁₀ (cp/rct)	Ct, medio	Dev St	CV (%)
std1	1,65	22,27	±0,62	2,79
std2	3,65	16,15	±0,46	2,84

9.2 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica di questo dosaggio quantitativo è stata valutata mediante analisi probit, determinando i limiti di quantificazione (**LOQ**) e di rilevabilità (**LOD**) sia considerando l'intero processo (dall'estrazione all'amplificazione) sia considerando solo la fase di amplificazione (qPCR).

Sensibilità analitica dell'intero processo: dall'estrazione all'amplificazione

Sono state estratti e amplificati almeno 18 replicati per ognuna delle 8 concentrazioni testate di pNL4-3mod, addizionato in sangue sieronegativo.

In seguito, sono state calcolate la media dei cicli soglia, le deviazioni standard e le percentuali di determinabilità (Tabella 4).

Tabella 4. Sensibilità analitica dell'intero processo determinata mediante analisi probit.

cp/ml	cp/reaz	n° ripetizioni	n° positivi	ct medio	dev.st	% rilevabilità
1200	54	18	18	22,05	0,88	100
1000	45	30	30	22,85	0,66	100
800	36	19	19	23,74	0,45	100
600	27	44	43	23,52	2,00	97,70
300	14	48	47	25,05	2,45	97,90
150	7	48	39	26,35	2,68	81,30
75	3	48	27	27,50	3,03	56,25
40	2	27	4	30,08	3,48	14,81

Il LOQ dell'intero processo è risultato essere di 36 cp/rct. Non avendo ottenuto un valore preciso di concentrazione per il LOD sia al 95% che al 50%, questi sono stati calcolati dalle curve generate considerando i due punti che comprendevano il valore percentuale desiderato (figura 17 A-B). Nello specifico, per il LOD al 95% (figura 17A), è stata costruita una retta utilizzando 300 cp/ml (97,9%) e 150 cp/ml (81,3%), mentre per il calcolo del LOD 50% (figura 17B) sono stati considerati i risultati relativi a 75 cp/ml (56,25%, tabella 5) e 40 cp/ml (14,81%).

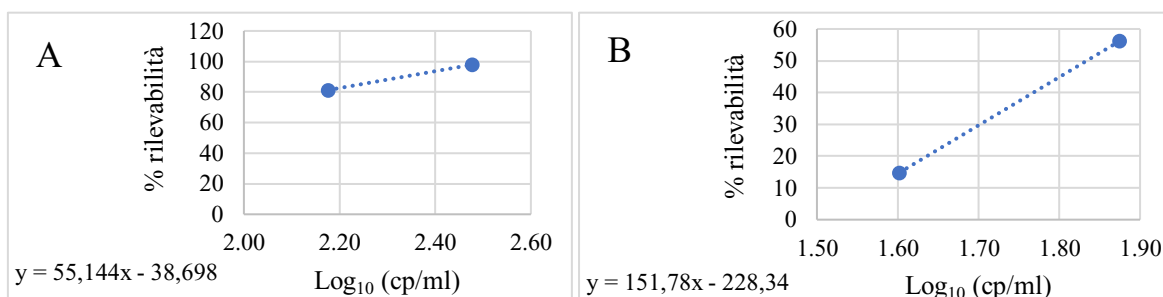


Figura 17. Regressioni lineari utilizzate per calcolare la concentrazione del LOD al 95% (A) e al 50% (B).

I valori del LOD, in termini di concentrazione, sono stati quindi ottenuti interpolando sulle rispettive rette (Figure 17 A-B) la percentuale di determinazione desiderata (95% e 50%). Pertanto, tali valori sono stati calcolati e non determinati sperimentalmente e risultavano essere di 12 cp/rct e 3 cp/rct, con una percentuale di successo rispettivamente del 95% e del 50%.

Sensibilità analitica della qPCR

Otto concentrazioni derivanti da diluizioni in ragione di 2 (da 80 a 0,62 cp/reaz) di pNL4-3mod sono state sottoposte solo al processo di amplificazione real-time con un numero di repliche per ciascun livello non inferiore a 10. Sono state, quindi, calcolate le medie dei cicli soglia, le deviazioni standard e le percentuali di determinazione (Tabella 5).

Tabella 5. Sensibilità analitica della qPCR determinata mediante analisi probit.

cp/reaz	n° ripetizioni	n° positivi	ct medio	dev.st	% detect
80	24	24	21,17	0,24	100,00
40	24	24	22,17	0,24	100,00
20	24	24	23,19	0,87	100,00
10	32	32	24,37	0,95	100,00
5	40	38	24,91	0,90	95,00
2,5	32	30	26,38	1,19	93,75
1,25	32	21	26,90	1,94	65,625
0,62	32	10	28,40	3,55	31,25

Il LOQ e il LOD al 95% erano coincidenti e sono risultati essere di 5 cp/rct. Tuttavia, non avendo ottenuto sperimentalmente il LOD al 50%, quest'ultimo è stato calcolato su una retta (figura 18) generata considerando, come punti, le concentrazioni che avevano una percentuale di determinabilità che comprendevano il 50% (come descritto sopra). Nello specifico, è stata costruita una retta utilizzando 1,25 cp/rct (65,63%) e 0,62 cp/rct (31,25%): il valore del LOD al 50%, in termini di concentrazione plasmidica, è stato quindi ottenuto interpolando sulla retta la percentuale di determinazione desiderata ed è risultato essere di 1 cp/rct.

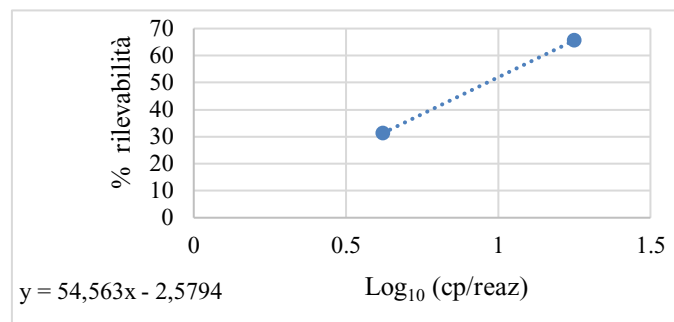


Figura 18. Regressione lineare utilizzata per calcolare la concentrazione del LOD al 50%.

Poiché il saggio messo a punto ha lo scopo di considerare tutte le fasi del processo analitico, per interpretare i risultati relativi ai campioni clinici è stato scelto, come limite di rilevabilità, il LOD al 95% che teneva conto dell'intero processo e cioè 12 cp/rct.

9.3 Campioni clinici

Per questo studio sono stati considerati 128 pazienti, di cui 62 mai trattati con farmaci antiretrovirali (naïve) e 66 con un'infezione cronica da HIV-1, in

terapia e con una viremia soppressa da non meno di 4 anni (Treated). In particolare, 36 dei pazienti in terapia, risultavano avere una viremia non rilevata da 8 fino ad un massimo di 12 anni, mentre in 14 pazienti il periodo di non rilevabilità andava da 4 a 8 anni (figura 19 A). Come criterio di clusterizzazione dei pazienti in terapia, è stata valutata anche la presenza di blip (rialzo viremico con viremia >40 cp/ml preceduto e seguito da periodi di non rilevabilità) durante il periodo di non rilevabilità preso in considerazione (figura 19 B). I pazienti sono stati quindi suddivisi in “blipper” (19) e “non blipper” (31).

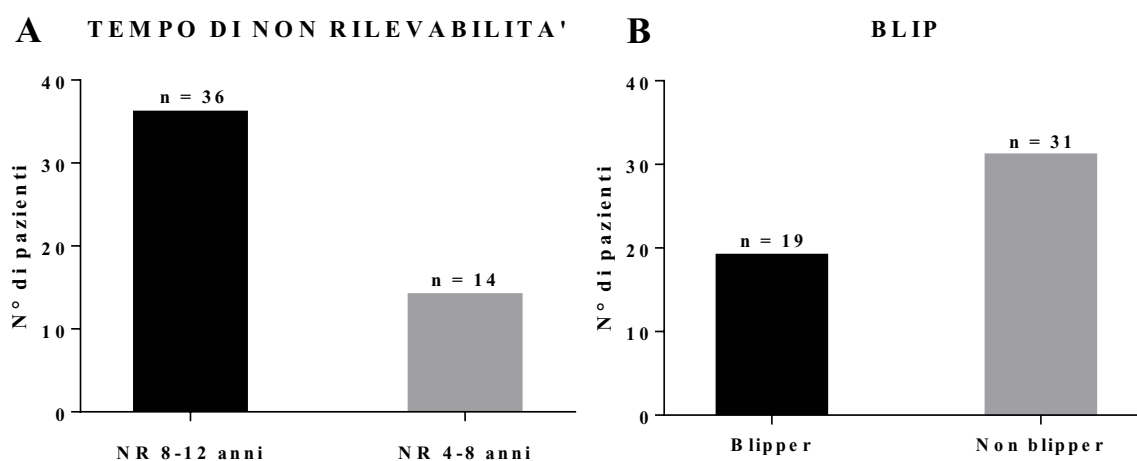


Figura 19. Distribuzione dei pazienti raggruppati in base al periodo di non rilevabilità (A) ed in base alla presenza/assenza di blip (B).

Per interpretare i risultati dei campioni clinici ottenuti in qPCR, è stata utilizzata la curva di calibrazione master riportata in figura 1. In generale, il DNA provirale è risultato non rilevabile in 7 campioni su 128 (5,5%); l’HIV-DNA era, invece rilevabile nei restanti 121 campioni (94,5%) sebbene 22 (17,2%) risultavano al di sotto del LOD al 95% (12cp/rct) (Figura 20).

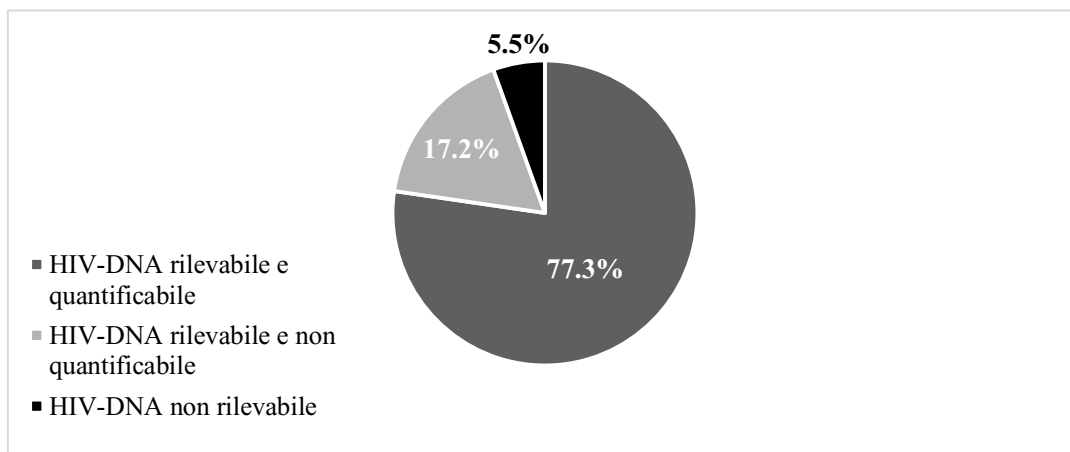


Figura 20. Rilevabilità e quantificabilità del DNA provirale nei campioni clinici analizzati utilizzando come cut-off il LOD al 95% (12 cp/rct).

È da notare che i campioni con un HIV-DNA non rilevabile o al di sotto del limite di rilevabilità risultavano appartenere tutti a pazienti inclusi nel gruppo dei trattati, mentre i campioni appartenenti a pazienti naïve erano tutti rilevabili e quantificabili.

L'assenza di inibizione nelle qPCR è stata sempre osservata, infatti, per tutti i campioni, si ottenevano valori del ciclo soglia comparabili (da 18 a 23) per il controllo interno che veniva aggiunto al campione in fase di estrazione del DNA e amplificato nella stessa seduta di qPCR del DNA provirale.

Per esprimere il risultato della quantificazione dell'HIV-DNA nei campioni dei pazienti è stato necessario normalizzare la concentrazione di provirus a quella delle cellule quantificando il numero totale di genomi cellulari presenti nell'estratto di DNA. Pertanto, il gene umano *hTERT* è stato utilizzato come misura dell'input di DNA e ha permesso, dunque, di normalizzare i risultati dell'HIV-DNA, inizialmente, per 10^5 linfociti se il campione derivava da un estratto di PBMC o 10^5 leucociti se derivava da un'estrazione di sangue intero. I risultati ottenuti su sangue intero sono stati, poi, normalizzati per 10^5 linfociti applicando le percentuali ricavate dai test clinici eseguiti dal laboratorio analisi

degli Ospedali Riuniti di Ancona sugli stessi campioni. Infine, tutti i risultati sono stati normalizzati ulteriormente per 10^5 CD4⁺, sempre utilizzando le percentuali fornite dai test clinici eseguiti in ospedale.

Sebbene con ampie differenze tra i diversi pazienti, la carica provirale risultava essere significativamente più alta ($p < 0,0001$; test U di Mann-Whitney) nei pazienti naïve rispetto ai pazienti trattati cronicamente considerando sia i risultati normalizzati per 10^5 linfociti (figura 21 A) sia quelli normalizzati per CD4⁺ (figura 21 B).

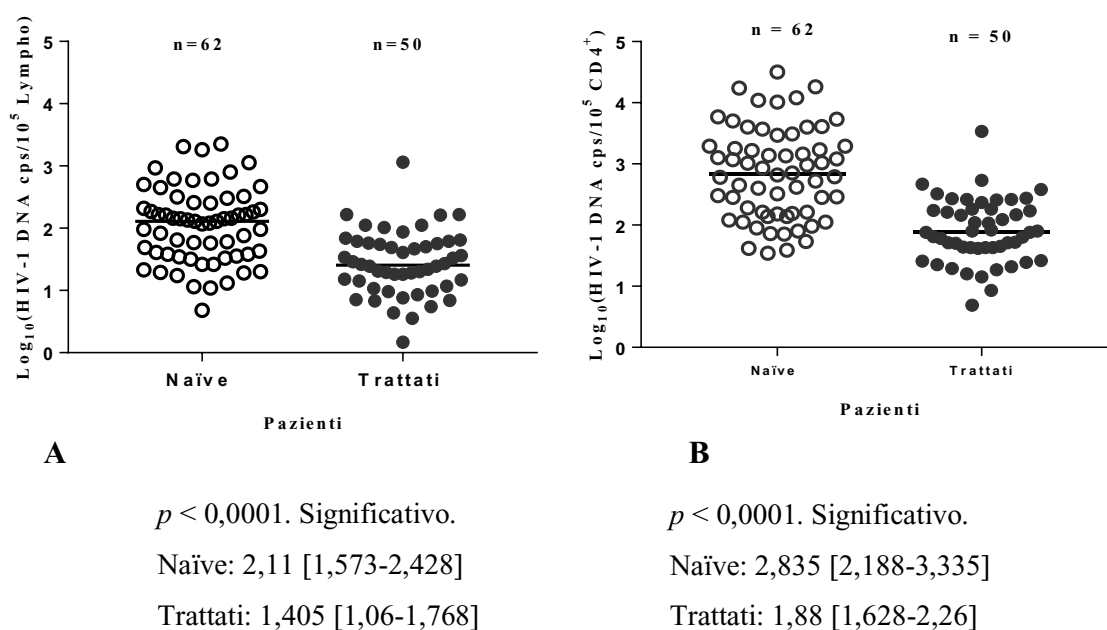


Figura 21. Confronto del carico provirale dell'HIV-1 considerando i risultati normalizzati per 10^5 linfociti (A) e 10^5 cellule CD4⁺ (B) in campioni clinici raggruppati sulla base della storia dell'infezione (naïve vs trattati). Sotto i due grafici sono riportati i valori di p , le mediane e, in parentesi, i range interquartile.

Suddividendo i pazienti del gruppo dei trattati, sulla base del tempo di non rilevabilità (figura 22 A-B) e sulla presenza di blip (figura 22 C-D), nessuna

differenza significativa era emersa tra i diversi raggruppamenti sia considerando la normalizzazione per linfociti che per CD4⁺.

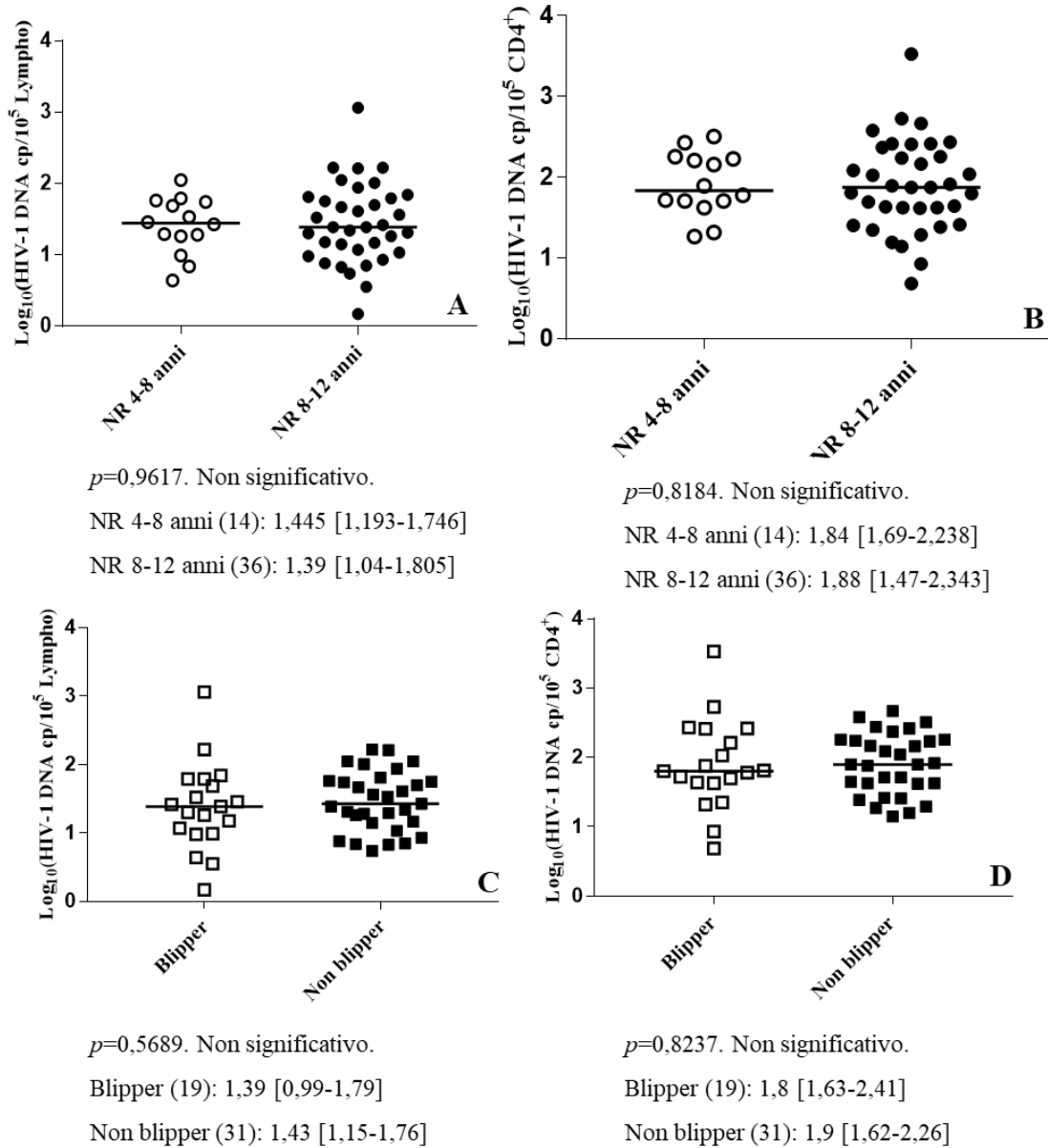


Figura 22. Confronto del carico provirale dell'HIV-1 in pazienti cronicamente trattati suddivisi sulla base del tempo di non rilevabilità (A-B) e in base alla presenza/assenza di blip (C-D). Sotto i due grafici sono riportati i valori di p , le mediane e, in parentesi, i range interquartile.

Per valutare se la dimensione del reservoir provirale potesse essere connessa allo stato immunitario del paziente, è stata condotta un'analisi statistica volta a verificare la correlazione tra il reservoir e la conta di linfociti e CD4⁺ (figura 23).

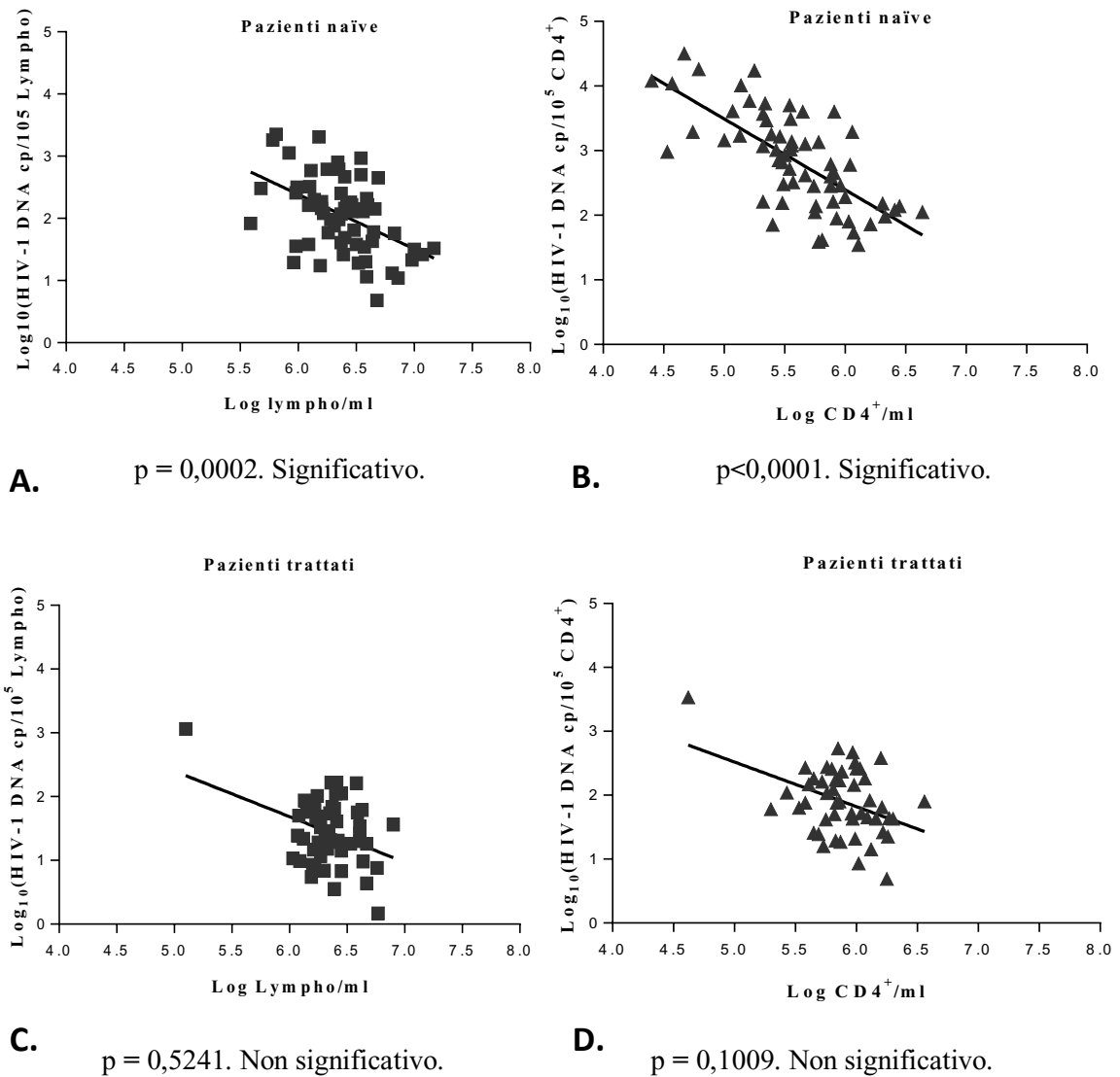


Figura 23. Correlazione negativa significativa tra le dimensioni del serbatoio provirale dell'HIV-1 e la conta di linfociti (A-C) e CD4⁺ (B-D) nei pazienti naïve. Correlazione non significativa nei pazienti in trattamento farmacologico.

Da quest'analisi è emersa la presenza di una correlazione (negativa) significativa tra le dimensioni del serbatoio provirale dell'HIV-1 e la conta di linfociti (figura 23 A-C) e $CD4^+$ (figura 23 B-D) solo nei pazienti naïve alla terapia antiretrovirale, come dimostrato dai risultati della correlazione di Spearman. Infine, una correlazione positiva e significativa (Spearman $\rho=0,4057$, $p=0,0011$) è stata osservata correlando i livelli plasmatici dell'HIV-RNA e il reservoir provirale di pazienti naïve al trattamento, normalizzando i risultati per 10^5 linfociti (figura 24 A). La correlazione tra viremia e reservoir è risultata essere ancora più forte (Spearman $\rho=0,519$, $p <0,0001$) quando si considerava il carico provirale normalizzato per $10^5 CD4^+$ (figura 24 B).

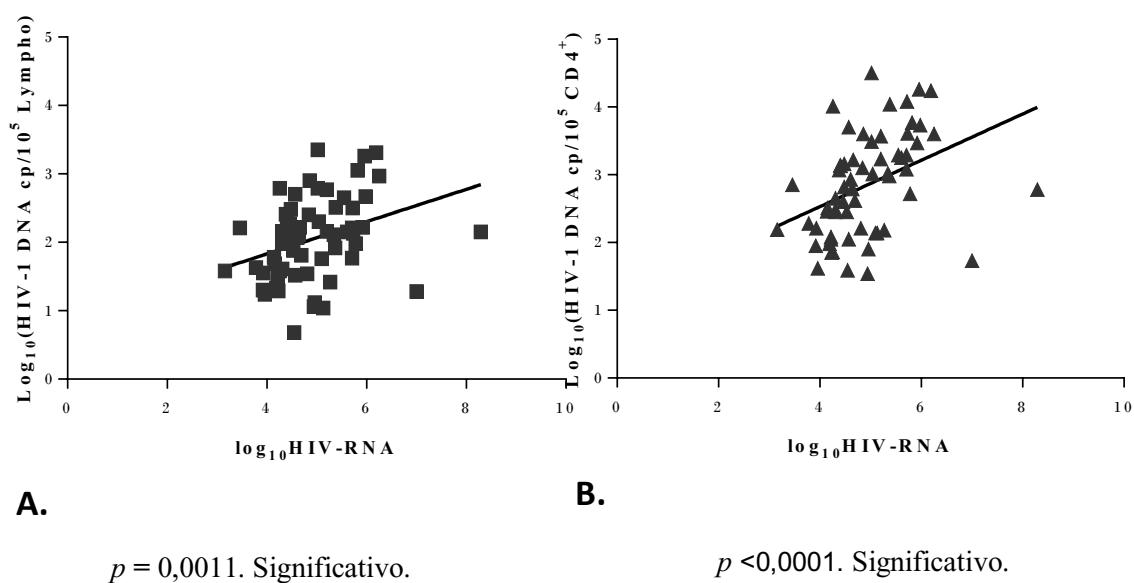


Figura 24. Correlazione tra i livelli plasmatici dell'HIV-RNA e il reservoir provirale di pazienti naïve considerando sia il dato normalizzato per 10^5 linfociti (A) che per $10^5 CD4^+$ (B).

10. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Per il trattamento delle infezioni da HIV, alla fine degli anni 80 erano disponibili pochi farmaci attivi sulla polimerasi virale. Sfortunatamente l'iniziale approccio monoterapico era inefficace e portava rapidamente alla comparsa di ceppi farmaco-resistenti. Pertanto, la monoterapia è stata, a metà degli anni 90, sostituita dalla terapia antiretrovirale altamente attiva che prevede la somministrazione di almeno tre farmaci appartenenti a due o più classi di inibitori (49). L'introduzione di queste potenti terapie antiretrovirali altamente attive ha profondamente cambiato l'approccio al trattamento dell'infezione da HIV riducendo notevolmente le morbidità e la mortalità associate all'HIV/AIDS (11). Tuttavia, anche se la HAART è in grado di abbassare la viremia plasmatica fino alla non rilevabilità, non risulta in grado di eradicare il virus dato che la sua interruzione o un eventuale fallimento terapeutico porta inevitabilmente ad un rebound virale e in generale ad un peggioramento delle condizioni del paziente (50). Infatti, malgrado l'efficacia comprovata della terapia antiretrovirale, il virus riesce a persistere integrato nel genoma della cellula ospite per anni (15). Per questo motivo, l'HIV-DNA è stato riconosciuto come un fattore prognostico abbastanza affidabile della progressione dell'infezione verso l'AIDS e la morte (16). L'HIV-DNA totale, infatti, viene ampiamente studiato come marker di persistenza e per la valutazione della dimensione del reservoir virale (40). Pertanto, l'elaborazione di un protocollo capace di valutare l'ampiezza del reservoir risulta essere di centrale importanza, dato che potrebbe giocare un ruolo chiave nella valutazione dell'efficacia del regime terapeutico soprattutto nei pazienti cronicamente trattati con un HIV-RNA non rilevabile da diversi anni (51).

In questo scenario, si inserisce questo lavoro di tesi basato sulla valutazione della dimensione del reservoir virale di pazienti infetti mediante la messa a punto di una metodica di estrazione e amplificazione per HIV-DNA, totalmente validata e controllata, sviluppata modificando un saggio commerciale quantitativo progettato per la quantificazione dell'HIV-RNA.

Per questo studio, infatti, è stato adattato un kit commerciale (Abbott) che risulta essere uno dei kit maggiormente utilizzati in tutto il mondo per la quantizzazione di HIV-RNA all'interno del plasma, grazie alla sua capacità di rilevare tutti i sottotipi di HIV-1 (52) incluso il sottotipo L recentemente identificato (53). L'utilizzo di un kit commerciale permette diversi vantaggi rispetto allo sviluppo di un protocollo "home-made" dato che consente di beneficiare del processo di ottimizzazione messo in campo dall'azienda in termini di specificità di sonde, primers e cinetica di amplificazione, conferendo, quindi, alla metodica una maggiore solidità e affidabilità.

La metodica standardizzata in questo studio si basa sulla selezione di uno standard di riferimento appropriato, il plasmide pNL4-3mod, che è stato utilizzato nello sviluppo della curva di calibrazione master e negli esperimenti di sensibilità analitica. Infatti, i due standard utilizzati negli esperimenti di calibrazione sono stati ottenuti dall'aggiunta del pNL4-3mod a concentrazioni adeguate, in campioni di sangue intero sieronegativo. La vera novità di questo approccio consiste nell'utilizzo di una curva su cui interpolare i risultati dei campioni generata processando gli standard esattamente allo stesso modo dei campioni. La manipolazione dei due standard come campioni clinici permette di considerare l'influenza esercitata dal processo di estrazione, evitando una qualsiasi sottostima del reservoir che si avrebbe nel caso in cui si utilizzasse una curva di calibrazione esterna.

Per quanto riguarda la selezione dei calibratori, una scelta diffusa nei saggi di quantificazione dell'HIV-DNA è la linea cellulare 8E5LAV. Tali cellule, derivate da leucemia linfoblastica, contengono un provirus di HIV per cellula integrato nel genoma (54). Tuttavia, studi hanno evidenziato una certa instabilità delle 8E5LAV a causa della perdita occasionale del provirus. Il meccanismo responsabile non è ancora del tutto chiaro, ma si ipotizza sia legato ad un'instabilità genomica dovuta alla fragilità del sito di inserzione nel genoma che rende le cellule 8E5LAV suscettibili alla perdita del DNA provirale (55). Pertanto, negli esperimenti di calibrazione, si è scelto di utilizzare il plasmide piuttosto che le 8E5LAV proprio per evitare che l'eventuale e incontrollata perdita del provirus da parte delle cellule potesse provocare una errata interpretazione dei risultati.

Inoltre, è stata verificata l'affidabilità e ripetibilità del presente saggio quantitativo, che utilizza pNL4-3mod come calibratore: dai confronti di variabilità è emerso che né le diverse diluizioni del plasmide né i differenti background genomici influivano sulle prestazioni dei due calibratori.

Infatti, in questo test per entrambi i calibratori sono stati ottenuti dei coefficienti di variazione totalmente sovrapponibili a quelli ottenuti durante i test per lo sviluppo della curva master.

Nel processo di messa a punto del metodo sono stati valutati i limiti di quantificazione e rilevabilità. Infatti, per interpretare i dati dei pazienti è stato considerato il LOD 95% ottenuto per l'intero processo (12 cp/rct), in quanto è risultato opportuno considerare entrambe le fasi, estrazione e amplificazione, a cui sono stati sottoposti anche i campioni clinici. Dal momento che qualsiasi processo di estrazione determina una perdita di materiale genetico quantificabile compresa tra il 50-70%, si comprende perché LOQ e LOD

dell'intero processo siano risultati più alti rispetto a quelli ottenuti considerando solo la qPCR.

La scelta di un appropriato campione clinico da analizzare per la quantificazione del DNA provirale di HIV è fondamentale per una precisa e attenta valutazione dell'estensione del reservoir. Sebbene, i PBMC sono la tipologia di campione che di solito si tende a preferire per analisi di questo tipo, il sangue intero permette una raccolta dei campioni più semplice e rapida. Pertanto, in questo studio è stato sviluppato un metodo di quantificazione dell'HIV-DNA ottimizzato per sangue intero ma applicabile anche ai PBMC a seconda della necessità. I PBMC potrebbero essere utili per quei pazienti il cui HIV-DNA, valutato a partire da un campione di sangue intero, risulta non rilevabile o al di sotto del LOD, dato che i tali cellule, derivando da una concentrazione del campione mediante gradiente, potrebbero avere un potere di risoluzione più elevato rispetto al sangue intero nella quantificazione del reservoir virale.

Dopo aver messo a punto il metodo è stato, quindi, possibile applicarlo a una serie di campioni clinici, sangue o PBMC a seconda della disponibilità del campione, selezionati sulla base della storia dell'infezione del paziente. Sono, infatti, stati scelti sia pazienti naïve e cioè pazienti che non avevano avuto precedenti esposizioni terapeutiche ad uno specifico farmaco sia pazienti cronicamente trattati con una viremia non rilevata da almeno 4 anni fino ad un massimo di 12. La metodica messa a punto in questo lavoro di tesi ha permesso l'accurata quantificazione dell'HIV-DNA in entrambe le categorie considerate. In generale, analizzando i risultati del saggio quantitativo su tali campioni è emersa una certa variabilità nei carichi provirali che probabilmente rifletteva le differenze nello stadio della malattia e nella sua progressione. Infatti, suddividendo i pazienti in base allo stato dell'infezione e analizzando

statisticamente i risultati, il reservoir è risultato significativamente più alto nei pazienti naïve rispetto a quello dei pazienti cronicamente trattati, a conferma del fatto che una terapia efficace può influire sulla riduzione del reservoir virale. In effetti, è noto come la HAART sia capace di determinare un decadimento dell'HIV-DNA (24, 55) con una velocità che sembrerebbe associata alla durata del trattamento antiretrovirale e alla fase dell'infezione in cui il paziente ha iniziato la terapia. Inoltre, la riduzione del reservoir virale avverrebbe molto più velocemente se la terapia venisse assunta nella fase iniziale dell'infezione (57).

Nessuna differenza significativa nella dimensione del reservoir è stata, invece, trovata suddividendo i pazienti con infezione cronica sulla base del tempo di non rilevabilità e della presenza di blip. La mancanza di differenze potrebbe essere dovuta ad uno sbilancio numerico dei pazienti afferenti alle diverse categorie. Pertanto, per poter effettuare un'analisi rappresentativa della realtà bisognerebbe aumentare il numero di pazienti da analizzare così da poter mettere a confronto gruppi con un numero di pazienti paragonabile.

Inoltre, nei pazienti cronicamente trattati si osservava una mancanza di correlazione tra il DNA provirale e la conta sia dei linfociti che dei CD4⁺. Questa assenza di correlazione è segnalata anche in altri studi che, però, consideravano non direttamente la conta dei CD4⁺ ma loro sottopopolazioni (58). Diversamente da quanto accadeva per i pazienti in trattamento, per i pazienti naïve si osservava una correlazione significativa tra il reservoir virale e la conta sia dei linfociti ma soprattutto dei CD4⁺, a conferma del fatto che l'HIV-DNA possa avere un buon valore predittivo del successo terapeutico data l'esistenza di una relazione tra l'ampiezza del reservoir e lo stato immunologico del paziente (29, 59-61).

Nei pazienti naïve, inoltre, la carica provirale è risultata statisticamente correlata con la carica virale, intesa come HIV-RNA plasmatico, valutata nello stesso campione, in accordo con altri studi che riportano, per questa categoria di pazienti, una correlazione positiva tra la viremia e il reservoir (29-31, 37, 62).

Il saggio quantitativo messo a punto in questa tesi non consente, tuttavia, la discriminazione tra provirus difettivi e competenti per la replicazione. L'importanza di distinguere queste due forme nella quantificazione del reservoir è stata documentata (27), dato che solo una piccola parte dei provirus integrati è in grado di determinare un rialzo virale e i test molecolari basati su real-time PCR non solo non distinguono tra le due forme ma amplificano, principalmente, la forma difettiva che risulta essere quella predominante (38). Tuttavia, dal punto di vista patogenetico, è stato dimostrato che anche i provirus difettivi giocano un ruolo importante: restano comunque trascrizionalmente attivi e sono in grado di produrre proteine virali che, oltre a contribuire alla patogenesi dell'HIV, ne facilitano la persistenza in tutto il corpo (63). Sebbene l'HIV-DNA totale possa essere considerato piuttosto impreciso e approssimativo come indicatore di persistenza, la quantificazione di tutte le forme virali, ognuna con un diverso significato biologico, ha portato alla maggior parte dei risultati negli studi sul reservoir (40). Infatti, la real-time PCR applicata allo studio del reservoir virale è ancora considerata una tecnologia precisa, sensibile e riproducibile che consente la quantificazione dell'HIV-DNA in sangue e tessuti.

La disponibilità di un test quantitativo per il DNA provirale, automatizzato, controllato e standardizzato sembra essere essenziale per la valutazione dei reservoir virali in contesti clinici in cui la sua quantificazione accurata sta diventando sempre più importante. Inoltre, la carica provirale può essere

considerata un marcatore aggiuntivo per fornire informazioni cruciali sullo stato del paziente e della malattia e per prendere decisioni terapeutiche (semplificazione: sì o no). Solo una valutazione approfondita non solo della viremia ma anche del reservoir potrà essere capace di caratterizzare a pieno il decorso dell'infezione da HIV-1 e fornirà una valutazione più completa sulla progressione della malattia.

Il presente saggio standardizzato, infatti, è in grado di fornire una quantificazione precisa dell'HIV-DNA totale periferico sia nei pazienti con infezione naïve che in quelli trattati con terapia antiretrovirale. Per comprendere il suo reale potenziale clinico, questo test per il monitoraggio del reservoir virale dovrebbe essere applicato in studi più ampi.

In conclusione, la disponibilità di un nuovo test standardizzato, come quello messo a punto in questa tesi, risulta di centrale importanza per valutare la reale soppressione virologica dei pazienti e per verificare l'efficacia di nuove terapie.

12. BIBLIOGRAFIA

- 1) Knipe D.M., Howley P.M., Cohen J.I., Griffin D.E., Lamb R.A. Fields Virology. 6° Edizione. Wolters Kluwer, Lippincott Williams. Capitolo 49. Human Immunodeficiency viruses: Replication. E.O. Freed, M.A. Martin. 49:1505.
- 2) Seitz R., Human Immunodeficiency Virus (HIV). 2016. Transfus med hemother. 43(3): 203–222.
- 3) Principi di virologia medica, III edizione, Antonelli G., Clementi M. Casa editrice Ambrosiana pag 303-312.
- 4) <https://www.unaids.org/en>.
- 5) Fanales-Belasio E., Raimondo M., Suligoi B., Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. 2010. Ann Ist Super Sanità. Vol. 46, No. 1: 5-14.
- 6) Nkeze J., Li L., Benko Z., Li G., Y Zhao R. Molecular characterization of HIV-1 genome in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. 2015. Cell & Bioscience. Volume 5, numero articolo: 47.
- 7) Ugolini S., Mondor I. and Quentin J. Sattentau. 1999. HIV-1 attachment: another look. Trends. Microbiology 7: 144-149.

- 8) Stevens S.W., and Griffith J.D. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 may preferentially integrate into chromatin occupied by L1Hs repetitive elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 5557-5561.
- 9) Groopman J.E., Benz P.M., Ferriani R., Mayer K., Allen J.D. and Weymouth L.A. 1987. Characterization of serum neutralization response to the human immunodeficiency virus (HIV). *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 3: 71-85.
- 10) Poli G., Vicenzi E.. HIV. 2007. *Enciclopedia della Scienza e della Tecnica.*
- 11) Wainberg M.A., Zaharatos G.J., Brenner B.G.. Development of antiretroviral drug resistance. *N Engl J Med.* 2011 Aug 18;365(7):637-46.
- 12) Pankrac J., Klein K., Mann J.F.S. Eradication of HIV-1 latent reservoirs through therapeutic vaccination. *AIDS Res Ther.* 2017 Sep 12;14(1):45.
- 13) Hosmane N.N, Kwon K.J., Bruner K.M., Capoferri A.A., Beg S., Rosenbloom D.I., Keele B.F., Ho Y.C., Siliciano J.D., Siliciano R.F. Proliferation of latently infected CD4⁺ T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics. *J Exp Med.* 2017 Apr 3;214(4):959.
- 14) Darcis G., Van Driessche B., Van Lint C. HIV latency: should we shock or lock? *Trends Immunol* 2017; 38: 217–28.

- 15) Ho Y.C., Shan L., Hosmane N.N., Wang J., Laskey S.B., Rosenbloom D.I., Lai J., Blankson J.N., Siliciano J.D., Siliciano R.F.. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*. 2013 Oct 24;155(3):540-51.
- 16) Williams JP, Hurst J, Stöhr W, Robinson N, Brown H, et al. SPARTACTrial Investigators. HIV-1 DNA predicts disease progression and post-treatment virological control. *Elife* 2014;3:e03821.
- 17) Tsiara C.G, Nikolopoulos G.K, Bagos P.G, Goujard C., Katzenstein T.L, et al. IMPACT OF HIV TYPE 1 DNA LEVELS ON SPONTANEOUS DESEAS PROGRESSION: A META-ANALYSIS. 2012. *Aids research and human retroviruses*. 8:366.
- 18) Sadowski I., Hashemi F. B.. Strategies to eradicate HIV from infected patients: elimination of latent provirus reservoirs. 2019. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 76 (18), 3583-3600.
- 19) Bosque A., Famiglietti M., Weyrich A.S., Goulston C., Planelles V. Homeostatic proliferation fails to efficiently reactivate HIV-1 latently infected central memory CD4⁺ T cells. 2011. *PLoS Pathog*. 7:e1002288.
- 20) Sigal A., Jocelyn T., Kim J.T., Balazs A.B., Dekel E., et al. Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. 2011. *Nature*. 477:95–98.

- 21) Chun T.W., Nickle D.C., Justement J.S., Meyers J. H., Gregg R., et al. Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. 2008. *J Infect Dis.* 197:714–720.
- 22) Gras G., Kaul M. Molecular mechanisms of neuroinvasion by monocytes-macrophages in HIV-1 infection. 2010. *Retrovirology.* 7:30.
- 23) Vanhamel J, Bruggemans A., Debyser Z. Establishment of Latent HIV-1 Reservoirs: What Do We Really Know?. 2019. *J Virus Erad,* 5 (1), 3-9. (NUOVO; GIÀ CAMBIATO)
- 24) Sarmati L., Parisi S. G., Nicastrì E., d’Ettorre G., Palmisano L., et al. Association between Cellular Human Immunodeficiency Virus DNA Level and Immunological Parameters in Patients with Undetectable Plasma Viremia Level during Highly Active Antiretroviral Therapy. 2005. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.* 43: 6183–6185.
- 25) Depincé-Berger A.E., Vergnon-Miszczyscha D., Girard A., Frésard A., Botelho-Nevers E., et al. Major influence of CD4 count at the initiation of cART on viral and immunological reservoir constitution in HIV-1 infected patients. *Retrovirology.* 2016 Jun 30;13(1):44.
- 26) Castro-Gonzalez S., Colomer-Lluch Ma, Serra-Moreno R.. Barriers for HIV Cure: The Latent Reservoir. 2018. *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES.* 34(9):739-759.

- 27) Bruner KM, Murray AJ, Pollack RA, Soliman MG, Laskey SB, et al. Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med.* 2016 Sep;22(9):1043-9.
- 28) Massanella M., Richman D. D. Measuring the latent reservoir in vivo. 2016. *J Clin Invest.* 126(2): 464-472).
- 29) Ceccherini-Silberstein F, Cozzi Lepri A, Alteri C., Merlini E., Surdo, et al. ICONA Foundation Study Group. Pre-ART HIV-1 DNA in CD4+ T cells correlates with baseline viro-immunological status and outcome in patients under first-line ART. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Dec 1;73(12):3460-3470.
- 30) Parisi SG, Andreis S, Mengoli C, Scaggiante R, Ferretto R, et al. Baseline cellular HIV DNA load predicts HIV DNA decline and residual HIV plasma levels during effective antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol.* 2012 Feb;50(2):258-63.
- 31) Bagnarelli P, Menzo S, Valenza A, Manzin A, Giacca M, et al. Molecular profile of human immunodeficiency virus type 1 infection in symptomless patients and in patients with AIDS. 1992. *J Virol.* 66(12): 7328–7335.
- 32) Viard JP, Burgard M, Hubert JB, Aaron L, Rabian C, et al. Impact of 5 years of maximally successful highly active antiretroviral therapy on CD4 cell count and HIV-1 DNA level. *AIDS.* 2004 Jan 2;18(1):45-9.

- 33) Casabianca A, Gori C, Orlandi C, Forbici F, Perno FC, et al. Fast and sensitive quantitative detection of HIV DNA in whole blood leucocytes by SYBR green I real-time PCR assay. *Mol Cell Probes*. 2007 Oct-Dec;21(5-6):368-78.
- 34) De Rossi A, Zanchetta M, Vitone F, Antonelli G, Bagnarelli P, et al. SIVIM (Italian Society of Medical Virology) Group Quantitative HIV-1 proviral DNA detection: a multicentre analysis. *New Microbiol*. 2010 Oct;33(4):293-302.
- 35) Casabianca A, Orlandi C, Canovari B, Scotti M, Acetoso M, et al. A real time PCR platform for the simultaneous quantification of total and extrachromosomal HIV DNA forms in blood of HIV-1 infected patients. *PLoS One*. 2014 Nov 3;9(11):e111919.
- 36) Hong F, Aga E, Cillo AR, Yates AL, Besson G, et al. Novel Assays for Measurement of Total Cell-Associated HIV-1 DNA and RNA. *J Clin Microbiol*. 2016 Apr;54(4):902-11.
- 37) Vicenti I, Meini G, Saladini F, Giannini A, Boccuto A, et al. Development of an internally controlled quantitative PCR to measure total cell-associated HIV-1 DNA in blood. *Clin Chem Lab Med*. 2018 Feb 23;56(3):e75-e77.
- 38) Bruner KM, Wang Z, Simonetti FR, Bender AM, Kwon KJ, et al. A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses. *Nature*. 2019 Feb;566(7742):120-125.

- 39) Rutsaert S, De Spiegelaere W, Van Hecke C, De Scheerder MA, Kiselinova M, et al. In-depth validation of total HIV-1 DNA assays for quantification of various HIV-1 subtypes. *Sci Rep.* 2018 Nov 22;8(1):17274.
- 40) Rouzioux C, Avettand-Fenoël V. Total HIV DNA: a global marker of HIV persistence. *Retrovirology.* 2018 Apr 3;15(1):30.
- 41) Elizabeth M. Anderson and Frank Maldarelli. Quantification of HIV DNA using droplet digital PCR techniques *Curr Protoc Microbiol.* 2018. 51(1): e62.
- 42) Liszewska M. K., Jianqing J. Y., O’Doherty U. Detecting HIV-1 integration by repetitive-sampling Alu-gag PCR. 2009. National Institute of Health. 47(4): 254–260.
- 43) Pauza C. D., Trivedi P., McKechnie T.S., Richman D.D., Graziano F.M. 2-LTR Circular Viral DNA as a Marker for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Vivo. 1994. *Virology.* 205 (2), 470-8.
- 44) Pace J.M., Grafa E.H., O’Doherty U. HIV 2-Long Terminal Repeat Circular DNA is Stable in Primary CD4+ T Cells. 2013. *Virology.* 441(1): 18–21.
- 45) Zheng Z., Bosch R.J., Chan E.S., Read S., Kearney M., et al. Predictors of Residual Viremia in Patients on Long-term Suppressive Antiretroviral Therapy. 2013. *Antivir Ther.* 18(1): 39–43.

- 46) Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., et al., The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. 2009. *Clinical Chemistry*. 55:4 611-622.
- 47) Bagnarelli P., Fiorelli L., Vecchi M., Monachetti A., Menzom S., et al. Analysis of the functional relationship between V3 loop and gp120 context with regard to human immunodeficiency virus coreceptor usage using naturally selected sequences and different viral backbones. 2003. *Virology*. 15:307(2):328-40.
- 48) CLSI, 2012. Document EP17-A2. Protocols for Determination of Limit of Detection and Limits of Quantitation. Approved Guideline. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- 49) Da-Yong L., Hong-Ying W., Nagendra Sastry Y., Bin X., Jian D., et al. HAART in HIV/AIDS Treatments: Future Trends. 2018. *Infectious Disorders - Drug Targets*. 18, 15-22
- 50) Ching-Lan L., Paia J. A., Nogueiraa L., Mendozaa P., Gruellb H., et al. Relationship between intact HIV-1 proviruses in circulating CD4+ T cells and rebound viruses emerging during treatment interruption. 2018. *PNAS*. vol.115, n°. 48, E11341–E11348
- 51) Darcis G., Moutschen M.. The effect of treatment simplification on HIV reservoirs. 2017. *Lancet HIV*. 4(8):e328-e329

- 52) Tang N, Huang S, Salituro J, Mak WB, Cloherty G, et al. A RealTime HIV-1 viral load assay for automated quantitation of HIV-1 RNA in genetically diverse group M subtypes A-H, group O and group N samples. 2007. *J Virol Methods*. 146:236-245
- 53) Yamaguchi J, McArthur C, Vallari A, Sthresley L, Cloherty GA, et al. Complete genome sequence of CG-0018a-01 establishes HIV-1 subtype L. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2019 Nov 6
- 54) Busby E., Whale A.S., Ferns R.B., Grant P.R., Morley G., et al., Instability of 8E5 calibration standard revealed by digital PCR risks inaccurate quantification of HIV DNA in clinical samples by qPCR. 2017. *Nature*. 7: 1209
- 55) Deichmann M., Bentz M., Haasa R.. Ultra-sensitive FISH is a useful tool for studying chronic HIV-1 infection. 1997. *Journal of Virological Methods*. 19-25
- 56) Re M. C., Vitone F., Biagetti C., Schiavone P., Alessandrini F., et al. HIV-1 DNA proviral load in treated and untreated HIV-1 seropositive patients. 2009. *Clin Microbiol Infect*. 16: 640–646
- 57) Ngo-Giang-Huong N., Deveau C., Da Silva I., Pellegrin I., Venet A., et al. Proviral HIV-1 DNA in subjects followed since primary HIV-1 infection who suppress plasma viral load after one year of highly active antiretroviral therapy. 2001. *AIDS*. 15:665–673
- 58) Poizot-Martin I, Faucher O, Obry-Roguet V, Nicolino-Brunet C, Ronot-Bregigeon S, et al. Lack of correlation between the size of HIV proviral

DNA reservoir and the level of immune activation in HIV-infected patients with a sustained undetectable HIV viral load for 10 years. *J Clin Virol.* 2013 Aug;57(4):351-5

- 59) Gibellini D, Borderi M, De Crignis E, Cicola R, Cimatti L, et al. HIV-1 DNA load analysis in peripheral blood lymphocytes and monocytes from naïve and HAART-treated individuals. *J Infect.* 2008 Mar;56(3):219-25
- 60) Depincé-Berger AE, Vergnon-Miszczycha D, Girard A, Frésard A, Botelho-Nevers E, et al. Major influence of CD4 count at the initiation of cART on viral and immunological reservoir constitution in HIV-1 infected patients. *Retrovirology.* 2016 Jun 30;13(1):44
- 61) Riva E., Antonelli G., Scagnolari C., Pistello M., Capobianchi M. R., et al., Human Immunodeficiency Virus (HIV) DNA Load and Level of Immunosuppression in Treatment-Naive HIV-1– Infected Patients. 2003. *The Journal of Infectious Diseases.* 187 (11), 1826-8
- 62) Chun T.W., Murray D., Justement J.S., Hallahan C.W., Moir S., et al. Relationship between residual plasma viremia and the size of HIV proviral DNA reservoirs in infected individuals receiving effective antiretroviral therapy. 2011. *J Infect Dis* 204:135–8.
- 63) Imamichi H, Dewar RL, Adelsberger JW, Rehm CA, O’Doherty U, et al. Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy. 2016. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113:8783–8.

11. RINGRAZIAMENTI

Ed eccoci qui, arrivati alla fine di un altro percorso.

Anche se questa volta è un po' diverso: è stato un viaggio intenso, uno di quei viaggi che ti insegnano qualcosa ogni giorno e che alla fine ti prendono un pezzetto di cuore.

All'inizio di questo percorso ero spaventata, ci sarebbero state tante cose da fare e tante altre cose da imparare in aggiunta alle lezioni, esami e al lavoro.

Mai mi sarei immaginata di trovare ciò che ho trovato. Sono stata catapultata all'interno di una grande famiglia, che mi ha accolta a braccia aperte e con il sorriso.

Per questo il mio primo ringraziamento va a tutte loro che mi hanno fatta sentire a casa, ed in particolare va a Betta, Palli e Mari per avermi accettata al loro fianco e con pazienza, dolcezza e dedizione mi hanno insegnato il loro lavoro.

Un grazie va anche alla mia professoressa Patrizia Bagnarelli, per la professionalità, per l'aiuto fornitomi e per la grande conoscenza che mi ha donato. Soprattutto grazie per avermi dato la possibilità di comprendere cosa significa fare il proprio lavoro con passione.

E poi ci sono loro, le mie compagne d'ufficio: le sclerate giornaliera di Tania che accompagnavano le mattinate nei primi periodi, a Rossana, la mia compaesana, a Sara che era sempre pronta ad aiutarmi. Ed infine un ringraziamento speciale va a Te, mia dolce Laura. Sei stata fin dal primo giorno il mio punto di riferimento. Mi hai presa sotto la tua ala e mi hai guidata in questo lungo percorso. Mi hai insegnato tanto, ma veramente tanto, e la dolcezza e spontaneità con cui lo hai fatto rimarrà sempre nel mio cuore. Non dimenticherò mai neanche il panico che ci assaliva e di come ci guardavamo pietrificate ogni volta che veniva citata la parola "contaminazione", oppure di

quella bellissima settimana che ha visto come protagonista la fantastica ZUCCHINA.

Insomma, è stato un periodo intenso ma tu lo hai reso meno duro di quanto poteva essere, con la gioia e voglia di vivere mattutina che solo tu potevi avere, in confronto alle facce mie e di Sara ahahaha.

“Scegli le battaglie per cui vale la pena lottare” mi dissi una volta, e devo dire che quella frase mi accompagna ogni giorno. Grazie, grazie e grazie veramente di tutto.

Devo dire grazie anche a mia madre e a mio padre che hanno permesso, non con pochi sacrifici, di poter intraprendere questo percorso e per avermi dato la possibilità di studiare. Grazie per l'enorme sostegno morale che mi avete sempre dimostrato, per avermi insegnato i valori della vita quotidiana, il rispetto, l'amore e la dedizione nel lavoro.

Un enorme grazie va anche a Franci, per essermi sempre stato accanto, per avermi supportato e soprattutto sopportato nei miei momenti di sconforto. Mi hai sempre spronata ad andare avanti perché tu sapevi che, nonostante tutto, io quella forza ce l'avevo e hai sempre fatto di tutto per farmela tirare fuori. Hai sempre creduto in me, sei stato la spalla su cui mi potevo appoggiare. Inutile dire quanto io ti sia grata, ed inutile dire quanto io ti ami amore mio.

Grazie anche a tutti i miei amici e ai compagni di corso, con cui ho passato le mie giornate tra lezioni, scleri, mille discorsi e tra tante risate.

Ed infine, un ringraziamento va anche a me stessa. Dico grazie per tutte quelle volte che ho stretto i denti e sono andata avanti. Grazie per tutti i sacrifici che ho fatto per poter portare a termine tutto quanto nei tempi prefissati. Grazie per la forza e la tenacia che ho dimostrato e grazie per essere riuscita ad imparare che tutto può essere affrontato a testa alta.

Questo è l'ultimo capitolo di questo libro, ma è il primo capitolo di questa nuova vita.

Una vita che non vedo l'ora di iniziare e che un po' mi spaventa.

Mi auguro di poter trovare il lavoro che ho sempre desiderato, di poter fare ogni giorno quello che amo. E soprattutto mi auguro di svegliarmi ogni mattina con la gioia nel cuore. Colgo l'occasione per dire alla me del futuro questa magnifica citazione:

“Che tu possa avere sempre il vento in poppa, che il sole ti risplenda in viso e che il vento del destino ti porti in alto a danzare con le stelle”.

In bocca al lupo per il futuro.

Roberta

