



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive

Dottorato di Ricerca in Scienze Infettivologiche

XXVI Ciclo

Tesi di Dottorato di Ricerca

***Monitoraggio del recupero immunologico nel GALT
in pazienti naïve HIV⁺***

Relatori:

Prof. Vincenzo Vullo

Dott.ssa Gabriella D'Ettorre

Candidato:

Dott. Stefano Stella

INTRODUZIONE	1
OBIETTIVO DELLO STUDIO	9
MATERIALI E METODI	10
Pazienti	10
Raccolta ed Elaborazione	10
Colture cellulari	12
Anticorpi monoclonali e fenotipizzazione delle cellule T	12
Misura dei biomarkers solubili	13
Analisi virologica	14
Analisi statistica.....	14
Immunoistochimica di CD4 e IL-17	14
RISULTATI	15
Caratteristiche della popolazione	15
Cambiamenti immunologici nel sangue periferico e nel distretto intestinale	16
Frequenza di cellule CD4 che esprimono IL17 e INF γ in periferia(PBMC) e nel distretto intestinale (LPLs) in pazienti naïve.	16
Sottotipo Th17: impatto dopo 32 settimane di terapia sulle frequenze delle cellule CD4 ⁺ Th17 nei PBMC e LPL.....	17
Sottotipo CD4 Th1: impatto di 32 settimane di HAART sulla frequenza delle cellule CD4 ⁺ IFN γ nei PBMC e nell'LPL.....	18
Cambiamenti nei markers plasmatici di traslocazione microbica	18
Marker di attivazione immunitaria periferica e ciclo cellulare nel tempo.....	19
Correlazione tra recupero CD4 e aumento di IFN γ e IL-17	20
Correlazione tra la ricostituzione delle CD4 nel GALT e i markers di traslocazione microbica,attivazione immunitaria sistemica e proliferazione cellulare	21
Analisi quantitativa delle cellule CD4 ⁺ T e CD4 ⁺ IL-17 prodotte nella mucosa intestinale	22
DISCUSSIONE	24
BIBLIOGRAFIA	34

INTRODUZIONE

La terapia antiretrovirale combinata (cART) e' in grado di indurre una persistente soppressione della replicazione del Virus dell'Immunodeficienza Umana (HIV), inducendo una sostanziale riduzione della morbidity e della mortalità nei pazienti HIV-1 positivi. Nonostante i significativi benefici ottenuti dalla cART, le persone affette da HIV-1 continuano a presentare una serie di fenomeni immunologici che si ipotizza derivino da uno stato di immunoattivazione sistemica cronica.

L'infezione da HIV-1 è caratterizzata da una progressiva perdita di linfociti T CD4+ e da una severa disregolazione del sistema immunitario, che determina lo sviluppo della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). La patogenesi dell'infezione da HIV-1 e' particolarmente complessa e inizia il suo corso durante la fase acuta dell'infezione con una robusta replicazione virale e la deplezione dei linfociti CD4+ a livello mucosale. I principali recettori per l'ingresso dell'HIV-1 all'interno delle cellule linfocitarie sono considerati i recettori CD4 e CCR5, che sono ampiamente espressi dai linfociti T memory. Questi linfociti memory sono particolarmente numerosi proprio a livello del tessuto linfocitario associate alla mucosa. A seguito dell'infezione da HIV-1, si assiste ad una rapida deplezione proprio a livello della mucosa intestinale già dopo le prime 3-4 settimane dall'infezione primaria. Mentre a livello del sangue periferico e dei linfonodi sono prevalenti i linfociti T CD4+ ,che non esprimono il recettore CCR5, perciò risparmiati durante la fase acuta di infezione.

E' noto che i linfociti CD4+ naïve si differenziano in cellule effettrici in seguito alla stimolazione da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC) e l'interazione tra il recettore delle cellule T (TRC) e l'MHC, espresso dalle APC stesse. I linfociti T CD4+ si possono differenziare in diverse sottopopolazioni a seconda del tipo di antigene presentato, dell'interazione con le cellule APC e del numero di citochine presenti localmente. L'eterogeneità di queste cellule assicura l'attivazione di differenti tipi di risposte da parte del sistema immunitario. Infatti l'attivazione di differenti sottopopolazioni di linfociti T CD4+ risulta nella produzione di distinti patterns di citochine, che a loro volta segnalano la presenza dell'antigene e inducono la risposta di differenti cellule del sistema immunitario.

I linfociti T-helper sono stati tradizionalmente classificati in base al profilo di citochine prodotte in due grandi sottopopolazioni: i linfociti Th1 e Th2.

I linfociti Th1, che sono considerati i mediatori della risposta immunitaria cellulare, sono caratterizzati dalla produzione e secrezione di Interferone gamma (IFN- γ) e interleuchina 2 (IL-2). Mentre i linfociti Th2 sono considerati i mediatori della risposta immunitaria umorale e a tal fine producono un particolare gruppo di citochine: interleuchina 4 (IL-4), interleuchina 5 (IL-5) e interleuchina 13 (IL-13).

Sebbene ancora non del tutto chiaro, la polarizzazione di queste cellule T CD4+ progenitrici verso un determinato subset di T-helper e' caratterizzato dalla presenza di particolari molecole stimolatorie espresse dalle APC.

Come detto precedentemente, la moltitudine di citochine presenti localmente induce l'attivazione di specifici fattori di trascrizione intracellulari. Infatti la

polarizzazione dei linfociti T CD4+ naïve verso i linfociti Th1 e' determinata dalla presenza di IFN- γ e IL-12, che a loro volta attivano i fattori di trascrizione: STAT1, STAT4 e Tbet.

Questi sono in grado di indurre la produzione da parte di questa sottopopolazione di linfociti T helper di IFN- γ , IL10 e TNF e inibire la produzione di IL-4, IL-5 e IL-6.

Allo stesso modo, la polarizzazione verso i linfociti Th2 e' indotta dalla presenza di IL-4, che attiva il fattore di trascrizione GATA3. Questo induce la produzione delle citochine specifiche di questo subset come: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e inibisce la produzione delle citochine appartenenti ai Th1.

Recentemente tuttavia sono stati individuati nuove sottopopolazioni di linfociti T helper, che espandono il paradigma Th1/Th2. Tra questi bisogna ricordare: i linfociti T-helper follicolari (Tfh); i linfociti T-helper che producono la interleuchina 9 (Th9). Inoltre grazie alla identificazione delle principali citochine che inducono la polarizzazione e dei fattori di trascrizione chiave per la produzione dell'Interleuchina 17, i linfociti Th17 sono stati definitivamente considerati come un nuovo e separato gruppo di linfociti T Helper.

Prima della identificazione delle citochine chiave per la differenziazione dei linfociti Th17, i linfociti CD4+ che producevano IL-17 erano considerate parte della sottopopolazione dei linfociti Th1. La relazione tra questi due distinte linee di linfociti T helper non e' ancora non del tutto chiara. Inizialmente, alcuni studi avevano suggerito la possibilità che i linfociti T CD4+ che producono IL-17 fossero una linea distinta dai Th1 ma che origina da uno stesso precursore cellulare. A seguito di numerosi studi, ad oggi i linfociti Th17 sono definiti dalla

secrezione dell'interleuchina 17 (IL-17) e dalla espressione del fattore di trascrizione ROR γ t, necessario per la loro differenziazione.

Nell'uomo tutte le cellule Th17 esprimono il recettore CCR6, il quale dirige il processo di homing di queste cellule verso la cute e alcuni siti mucosali. Inoltre una parte dei linfociti Th17 esprime il recettore CCR5 e il recettore per la migrazione verso l'intestino α 4 β 7, che rappresentano dei co-recettori per l'entry dell'HIV.

La maggior parte dei linfociti Th17 esprimono anche il recettore IL23R per l'interleuchina 23, la quale agisce come una citochina proinfiammatoria necessaria per l'espansione e la persistenza di questa classe di linfociti. L'espressione di questi recettori che ne dirigono l'homing, le funzioni proinfiammatorie e la massiccia presenza a livello della lamina propria del tratto intestinale indicherebbe il ruolo fondamentale dei linfociti Th17 nella difesa mucosale.

I linfociti Th17 rappresentano dal punto di vista immunologico un subset di cellule T effettrici che promuovono il processo di infiammazione stimolando il rilascio di citochine, l'espressione di chemochine e il reclutamento di neutrofili nel sito di infiammazione. I linfociti Th17 sono coinvolti nelle risposte di tipo infiammatorio protettive verso una varietà di batteri e funghi, specialmente a livello dei siti mucosali e della cute. Tuttavia, essi sono stati anche coinvolti in processi infiammatori alla base dei patologie auto-immuni. I linfociti Th17 non producono solamente IL-17, ma possono secernere anche TNF α , IL-1, IL-2, IL-21 e IL-22, tutte citochine con una forte funzione pro-infiammatoria. I linfociti Th17 sono inoltre in grado di reclutare i neutrofili e le cellule mieloidi nei siti

effettori attraverso la produzione del fattore stimolante le colonie granulocitiche (G-CSF). Infine, i linfociti Th17 sono anche coinvolti nei processi di rigenerazione epiteliale a livello dei tessuti mucosali. Dal punto di vista funzionale, i linfociti Th17 sono coinvolti nei processi di difesa contro batteri extracellulari come *Mycobacterium Tuberculosis* e funghi come *Candida albicans*. I linfociti Th17 sono inoltre implicati nello sviluppo di diverse patologie auto-immuni.

Il ruolo dell'IL-17 è stato recentemente descritto nel corso di patologie come morbo di Crohn, psoriasi e dermatite atopica. Ad esempio, nel caso delle patologie infiammatorie intestinali come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa, esiste una associazione tra l'infiammazione mucosale e il numero di cellule che producono IL-17 a livello della mucosa stessa quando comparata con soggetti sani.

Un'aumentata produzione di IL-17 nel plasma e' stata inoltre messa in evidenza anche in altre patologie infiammatorie come l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso sistemico e lo scleroderma.

Recenti studi descrivono un nuovo sottotipo di cellule CD4 (Th17) presenti nella mucosa intestinale. Queste cellule giocano un ruolo importante nell'eradicazione degli agenti patogeni presenti nella mucosa tramite la produzione di IL-22 e IL-17, che inducono nelle cellule epiteliali l'espressione di peptidi antimicrobici e modulano la risposta pro infiammatoria. (Brand et al¹. 2006; Andoh et al². 2005).

Nella patogenesi da HIV, che causa la distruzione dell'integrità della mucosa intestinale, l'intestino è considerato il primo e più importante organo colpito dal virus.

La perdita di integrità permette il passaggio del virus dal lumen intestinale al sistema circolatorio (traslocazione microbica). Brenchley et al. 2006, Marchetti et al. 2008.

Gordon nel 2010 ha ipotizzato che la traslocazione microbica potrebbe essere il fattore chiave dell'attivazione immunitaria sistemica e della progressione verso l'AIDS.

Rispetto al sangue periferico, i tessuti gastrointestinali non sono facilmente accessibili e solo di recente sono stati esaminati. Studi su sezioni trasversali di tessuti gastrointestinali, su pazienti naïve per HAART, confermano una perdita di CD4⁺Th17 proporzionale allo stadio dell'HIV. (Brenchley. 2008, Ciccone et al., 2011). La moderna terapia antiretrovirale (ART) ha trasformato l'infezione da HIV in una malattia cronica gestibile nei paesi ad alto reddito. Tuttavia gli individui con HIV con accesso a regime ART continuano ad avere dieci anni in meno di aspettativa di vita (Bhaskaran et al., 2008; Collaborative TATC 2010), e sembrano essere più inclini a malattie del fegato, cardiovascolari, renali (Deeks et al., 2009). Una delle ragioni della maggiore morbilità e mortalità è stata associata ad uno status permanente di attivazione immunitaria, nonostante l'efficacia della terapia ART (Kuller et al. 2008).

L'attivazione delle cellule T e dei marcatori solubili dell'infiammazione restano elevati anche in individui ART soppressi per molti anni (Piconi et al. 2010; Gaardbo et al., 2012; Pinzone et al., 2012).

Negli ultimi anni, le cause della persistente infiammazione sistemica sono state studiate ampiamente, e molti studi si sono focalizzati sul possibile ruolo della disfunzione immunitaria della mucosa e sulla deplezione delle cellule CD4 intestinali con conseguente traslocazione microbica ed attivazione immunitaria cronica (Brenchley et al., Nat Med 2006). Tendenze emergenti suggeriscono che la popolazione CD4⁺Th17 nell'intestino associata ai tessuti linfoidi (GALT) possa essere una fonte innata e di immunità adattativa che produce una risposta infiammatoria antimicrobica robusta e che mantenga l'integrità della mucosa. Le cellule CD4⁺Th17 costituiscono una linea distinta da Th1 e Th2 e si caratterizzano per la produzione di un sottoinsieme di citochine (IL17A, IL17F, IL22 e IL26) (Stockinger et al., 2007). È stato suggerito che la patogenesi dell'infezione da HIV potrebbe essere associata alla disregolazione delle CD4⁺Th17 mucosali e alla traslocazione microbica intestinale (Chege et al 2011, Brenchley et al 2006). Esperimenti effettuati su animali hanno dimostrato che IL-17 riduce la diffusione sistemica dell'infezione batterica dall'intestino(Raffaelli et al. 2008) e che la perdita delle cellule CD4⁺ Th17 durante l'infezione SIV nei macachi è associata alla progressione della malattia (Cecchinato et al., 2008. Studi su sezioni trasversali su pazienti in diverso stadio di infezione da HIV hanno confermato la perdita di CD4⁺TH17 del tratto gastrointestinale, e che la gravità della perdita è proporzionale allo stadio del HIV (Brenchley et al., 2008; Ciccone et al., 2011; Salgado et al., 2011). Una forte relazione è stata trovata tra la perdita di CD4⁺Th17, interruzioni della mucosa e traslocazione microbica (Brenchley et al., 2008; El hed et al., 2010). Questi studi hanno rivelato

l'importanza del GALT nella patogenesi dell'infezione da HIV, ma dal momento che i tessuti gastrointestinali non sono facilmente accessibili per l'analisi, i dati relativi all'immunopatogenesi sono ancora incompleti. La ricostituzione dopo HAART delle CD4⁺Th17 nel GALT è ancora controversa. Lo scopo del presente studio era di esplorare la variazione delle frequenze delle cellule CD4⁺Th17 nel GALT di nove pazienti introdotti alla HAART e il rapporto tra la ripopolazione delle cellule intestinali in 32 settimane di terapia e i markers di attivazione immunitaria sistemica.

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Considerando le informazioni limitate alla ricostituzione del sistema immunitario nel GALT in presenza di HAART, in questi tre anni, il nostro lavoro si è rivolto ad incrementare il numero dei pazienti reclutati, ad analizzare i dati raccolti in riguardo alla ricostituzione del sottotipo CD4⁺Th17 e CD4⁺Th1 nel GALT, e all'analisi della correlazione tra ricostituzione immunitaria, attivazione dei markers e traslocazione microbica

MATERIALI E METODI

Pazienti

Nei tre anni di studio sono stati reclutati 11 pazienti HIV⁺, in un unico centro clinico, la Divisione di Malattie Infettive, Dipartimento di Medicina, Ospedale dell'Università "Sapienza" di Roma, per uno studio longitudinale.

Tutti i pazienti erano naïve per ciascun trattamento antiretrovirale ed eleggibili alla HAART, e rientravano secondo le linee guida internazionali per iniziare la terapia antiretrovirale (HAART).

I criteri di esclusione sono stati: trattamento con glucocorticosteroidi o qualsiasi farmaco immunomodulante per più di 7 giorni nel mese precedente, qualsiasi tumore sistemico passato o presente, storia di malattia infiammatoria nell'intestino tenue o nel colon, anemia, uso di anticoagulanti e gravidanza. Lo studio, ha ricevuto l'applicazione dal comitato etico e ciascun paziente ha sottoscritto il consenso informato scritto. I pazienti sono stati autorizzati a recedere dal presente studio in qualsiasi momento. Lo studio è stato completato per nove pazienti.

Raccolta ed Elaborazione

I pazienti sono stati campionati, (20ml) di sangue periferico prima dell'inizio della terapia antiretrovirale (T0) e dopo 32 settimane (32W). Allo stesso tempo i partecipanti hanno subito procedure endoscopiche somministrando PEG 24 ore prima dell'esame per il lavaggio del colon. La procedura endoscopica è stata

eseguita con sedazione cosciente (midazolam 5mg/i.v.) e con l'utilizzo di pinze biottiche (Radial Jaw 4, Boston Scientific, Natick, Massachusetts, USA). Tutti i pazienti sono stati sottoposti a colonscopia totale e ileoscopia retrograda per almeno 10 cm dall'ileo distale, con endoscopio convenzionale o slim (model CF o PCF 160 AI, Olympus Medical Europe GmbH, Hamburg, Germany).

Abbiamo ottenuto campioni (tre per la valutazione istologica e tre per studiare l'immunità mucosale) dell'ileo terminale, ascendente, trasverso, colon discendente e sigma utilizzando una pinza biottica standard. I campioni per la valutazione istologica sono stati fissati in soluzione di formaldeide al 4%. Le biopsie per lo studio immunologico sono state elaborate lo stesso giorno della colonscopia. I PBMC sono stati ottenuti mediante centrifugazione su gradiente di Ficoll (Lympholyte, Cederline Laboratories, Hornby, Ontario, Canada). Sono state ottenute 10-12 della mucosa macroscopicamente normale in ciascun tratto intestinale. In breve, le biopsie raccolte in RPMI 1640 sono state lavate due volte con EDTA, poi risospese in soluzione di EDTA 5mM. Il supernatante, contenente i linfociti intraepiteliali (IELs) è stato rimosso, e le biopsie sono state incubate per 1 ora a 37°C in soluzione con collagenasi 1mg/mL(Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e 1,5U-DNAse(Invitrogen, Carisbad, CA), che consente l'isolamento dei linfociti della lamina propria (LPL), successivamente filtrati attraverso un colorante cellulare 70µm.

Le cellule ottenute sono state contate e risospese.

Colture cellulari

Le cellule mononucleate isolate dal sangue periferico e dalle biopsie intestinali (LPL e PBMC) sono stati seminate ad una concentrazione di 2×10^6 cellule/ml con RPMI+ siero fetale bovino al 10%(FBS) inattivato con calore e poi stimolate per una notte(37°C e 5% CO₂) in presenza del solo terreno o con PMA (phorbol myristil acetate) (3ng/ml,Sigma Aldrich,Milano, Italia) e ionomicina (1µM Sigma Aldrich, Milano, Italia).

Streptochinasi (SK,10µg/ml, Sigma Aldrich Milano, Italia) o Candida albicans (Ca,10µl/ml gentilmente fornito dal Dr A. Cassone,Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia) sono state utilizzate per la stimolazione delle cellule T antigene specifiche.

Tutte le stimolazioni sono state eseguite in presenza di Brefaldina-A (BFA 1µg/ml,Sigma Aldrich,Milano,Italia) per 12 ore.

Le cellule sono state raccolte, lavate e colorate per la determinazione fenotipica.

Anticorpi monoclonali e fenotipizzazione delle cellule T

Un'analisi tramite citofluorimetria di flusso multiparametrica è stata eseguita su cellule PBMC e LPL stimolate. Le cellule sono state fissate e permeabilizzate (Fixation Buffer e Permeabilization Wash Buffer, BioLegend Cambridge, UK) e marcate con fluorocromi:CD3-FITC,CD4-PE,IFN γ -PerCP e IL-17-alexa-fluor-647 (BioLegend, Cambridge, UK). Le cellule CD4⁺Th1 CD4⁺Th17 sono state identificate mediante CD3⁺, CD4⁺, IFN-gamma e CD3⁺, CD4⁺, IL-17A⁺, rispettivamente.

L'attivazione e i livelli ciclici nei PBMC sono stati identificati dopo permeabilizzazione con Kit BD IntraSure™ e colorati con CD3, CD4, CD8, CD38, Ki67 and HLADR (Becton Dickinson Italia, Milano, Italia). Le acquisizioni e le analisi sono state eseguite su un citofluorimetro FACScalibur con Cell Quest® software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Misura dei biomarkers solubili

I campioni di plasma sono stati analizzati utilizzando il saggio di Limulus Amebocyte per i livelli di LPS (Lonza Group, Switzerland) e utilizzando la tecnica ELISA per CD14 solubili (sCD14)(R&D Systems, Mnneapolis,Minnesota,USA). I test sono stati eseguiti secondo le istruzioni dei costruttori. La reazione a catena della polimerasi quantitativa (PCR) è stata utilizzata per misurare i livelli di plasma batterico 16S rDNA. Una reazione da 20 µL consisteva di TaqMan Fast Universal PCR Master Mix, 0.5 µmol/L e reverse primers, 0.32 µmol/L probe (338P: 5'-FAM-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-BHQ1-3').I primer: in avanti (8F: 5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') e inversa (515R: 5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3') sono stati utilizzati per amplificare il DNA che codifica 16S rRNA (Brining et al., 2003).

Sono stati calcolati i valori medi; una curva standard è stata creata da diluizioni seriali di DNA plasmidico contenente un numero noto di copie. Le condizioni di reazione per l'amplificazione del DNA erano 95°C per 5 min, seguiti da 45 cicli a 95°C per 15 s e a 60°C per 1 min.

Analisi virologica

I campioni di plasma sono stati analizzati per HIV-1 RNA utilizzando il saggio VERSANT® HIV-1 RNA 1.0 kPCR, con un limite di rilevabilità di 37 copie/ml.

Analisi statistica

Le analisi statistiche e le rappresentazioni grafiche sono state fatte utilizzando il software SPSS, versione 20.00 (IBM,Somers,NY,USA). I dati sono stati analizzati utilizzando il test U di Mann-Whitney (variabili quantitative) e il test di Wilcoxon per confrontare le variabili continue. Il coefficiente di correlazione di Spearman è stato utilizzato per valutare le correlazioni tra le variabili quantitative. I livelli di significatività statistica sono stati fissati con $p \leq 0.05$.

Immunoistochimica di CD4 e IL-17

Le biopsie del colon inclusi in paraffina e fissati in formalina sono state sezionate con spessore di 4 μ M e posti su vetrini. Dopo deparaffinizzazione, i vetrini sono stati reidratati e il recupero dell'antigene avviene dopo passaggio in microonde dopo l'uso di per ossidasi endogena. Le sezioni sono state incubate con una diluizione: 1:200 di anticorpo monoclonale di coniglio anti-CD4(Epitomics Inc., Burlingame, CA o diluizione 1:100 di anticorpo policlonale di capra anti_IL17 (R&D Systems), seguito da una diluizione 1:250 degli anticorpi bioatinilati anti-coniglio (Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA) o anticorpi anti-capra (Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA).

RISULTATI

Caratteristiche della popolazione

Nella **tabella 1** sono riportate le caratteristiche della popolazione.

Tutti i nove pazienti che hanno terminato lo studio erano maschi caucasici, con età media di 41 anni (range 27-63) e un tempo medio di due anni dalla diagnosi di infezione da HIV. Tutti i soggetti erano in stadio A della classificazione CDC tranne uno (con la diagnosi in fase 3) e naïve alla terapia antiretrovirale (ARV).

La media di CD4 nadir era 354 cell/µl, e HIV RNA zenith range da 3.69-5.83 log copie/ml. Tutti i pazienti hanno iniziato la terapia antiretrovirale dopo aver effettuato l'esame endoscopico.

La terapia consisteva in tenofovir-emtricitabine NRTI backbone (TDF/FTC, 300/200 mg/ml, uno al giorno) associati a inibitori della proteasi potenziato, lopinavir/ritonavir (LPV/r,400/100 mg , due volte al giorno, o darunavir/ritonavir (DRV/r 800/100mg una volta al giorno. Al momento dell'arruolamento lo stato viremico dei pazienti era (media 4.68 log copie HIV-RNA, range 3.60-5.83) e una media di cellule CD4 pari a 367 cells/ml, range 145-720 cell/µl. La media in percentuale di cellule CD4 nel sangue era 16.0 (range 5.0-30.0), significativamente superiore rispetto alla percentuale di cellule CD4 presenti nell'intestino 10.1(range: 4.0-16.1 ,p=0.009). Una lieve correlazione è stata trovata tra i due distretti.

Cambiamenti immunologici nel sangue periferico e nel distretto intestinale

Dopo 32 settimane di HAART tutti i pazienti tranne uno avevano meno di 1.56 log HIV RNA/ml copie nel plasma; il paziente 09 (unico paziente con diagnosi di studio C3) ha avuto 2.28 log HIV-RNA. Tutti i pazienti hanno mostrato nel distretto periferico un recupero di CD4, in valore assoluto (la media di CD4 era 472 cell/ μ l, range 241-591, $p=0.011$) e in percentuale (23.0%, range 7.0-38.0, $p=0.008$).

Un buon recupero di CD4 si è osservato anche nell'intestino, con un incremento medio in percentuale dal 5.2% al 31.0%, rispetto ai valori pre HAART ($p=0.008$). (**Tabella1, Fig1A**).

È stata osservata un'associazione significativa tra la percentuale di cellule CD4 tra i due distretti ($r=0.759$, $p<0.001$, **Fig.1B**

Frequenza di cellule CD4 che esprimono IL17 e INF γ in periferia(PBMC) e nel distretto intestinale (LPLs) in pazienti naïve.

Per valutare come l'infezione da HIV abbia effetti sull'omeostasi delle cellule CD4⁺Th1 e Th17 nel sangue e nell'intestino, abbiamo esaminato le frequenze e il fenotipo delle cellule CD4 che esprimono IL17 e INF γ nei due distretti dopo stimolazione overnight con mitogeni e antigeni specifici. Non sono state osservate differenze nei due distretti in relazione alle CD4Th17 coltivate con medium (PBMCs: 0.0, range 0 - 0.03; LPLs: 0.04 range 0 - 0.43; $p=0.11$) o PMA (PBMCs: 0.92 range 0.32 - 2.56; LPLs: 1.98 range 0 - 3.93; $p=0.86$).

Le cellule CD4Th17 in media sono superiori nell'intestino rispetto ai PBMC quando i linfociti sono stati stimolati overnight con streptokinase (SK) (PBMCs: 0.0 range 0 - 0.05; LPLs: 0.10 range 0 - 3.45; $p=0.014$) e *Candida albicans* (Ca) (PBMCs: 0.0 range 0 - 0.03; LPLs: 0.11 range 0.0 - 0.96; $p=0.019$).

Nei PBMC in media la frequenza di CD4 che producono IFN γ erano significativamente superiori a quelli trovati in LPL quando venivano stimolati con PMA (PBMCs: 16.7 range 7.95 –31.82; LPLs: 4.03 range 0.0 – 14.07; $p=0.002$) mentre la risposta al Ca fu significativamente più alta in LPL (PBMCs: 0.0 range 0.0 - 0.02; LPLs: 0.34 range 0.0 – 1.58; $p=0.005$). La produzione di IFN γ nelle cellule non stimolate (PBMCs: 0.0 range 0.0 – 4.21; LPLs: 0.05 range 0.0 – 1.39; $p=0.35$) o stimolate con SK (PBMCs: 0.01 range 0.0 – 0.09; LPLs: 0.20 range 0.0 – 4.55; $p=0.07$) erano diminuite in entrambi i distretti.

Sottotipo Th17: impatto dopo 32 settimane di terapia sulle frequenze delle cellule CD4⁺Th17 nei PBMC e LPL

Abbiamo poi cercato di determinare se 32 settimane di HAART potrebbero avere un impatto sulle frequenze e la funzionalità del sottotipo CD4⁺Th17. In **figura 2 A** riportiamo i risultati riscontrati nel distretto periferico e nell'intestino. Nei PBMC si è osservato un lieve aumento della frequenza delle CD4⁺Th17 tra l'inizio e la trentaduesima settimana in condizioni non stimolate ($p=0.058$), ma non sono state osservate differenze statisticamente significative dopo stimolazione con PMA,SK e Ca ($p=0.465$ e $p=0.684$).

Nel distretto intestinale la percentuale di cellule CD4⁺Th17, senza qualsiasi stimolo non ha evidenziato variazioni significative dopo terapia HAART(p=0.483).

Rispetto ai valori pre-HAART , le frequenze di CD4⁺Th17 erano leggermente aumentate dopo stimolazione con PMA e SK (p=0.066 e p=0.85).

Nel complesso si è osservato un incremento statisticamente significativo delle Cd4⁺Th17 dopo stimolazione con Ca (p=0.021).

Sottotipo CD4 Th1: impatto di 32 settimane di HAART sulla frequenza delle cellule CD4⁺IFN γ nei PBMC e nell'LPL

Per valutare la variazione del sottotipo Th1 in periferia e nell'intestino sono state valutate le CD4⁺IFN γ , prima e dopo 32 settimane di terapia HAART. Nei PBMC non stimolati non sono state osservati cambiamenti significativi nelle frequenze di CD4⁺Th1(p=0.237) o stimolati con PMA (p=0.499); un aumento più consistente delle frequenze CD4⁺Th1 si è osservato nei PBMC in presenza di SK (p=0.043) e CA(p=0.116). L'incremento delle frequenze nella risposta Th1 si è osservato anche nel tessuto linfoide intestinale, con un incremento significativo delle cellule CD4⁺IFN γ in seguito alla stimolazione con PMA (p=0.050) e SK (p=0.036). **(Fig.2B)**

Cambiamenti nei markers plasmatici di traslocazione microbica

Per collegare il grado di compromissione della mucosa con la diffusione di prodotti

batterici, abbiamo valutato i livelli plasmatici di lipopolisaccaride (LPS), DNA batterico che codifica per la subunità 16S rRNA subunità (16S DNA) e solubile CD14(sCD14) che viene secreta nel plasma da LPS dai monociti attivati. Non è stata osservata nessuna riduzione significativa dopo 32 settimane di terapia HAART nei livelli plasmatici di LPS, 16SDNA e sCD14, anche se una leggera diminuzione è stata osservata nei livelli di LPS (basale: 5.69 pg/ml, range 3.21 – 6.32, T6: 4.88 pg/ml, range 2.5 - 6.34, $p=0.214$, **Fig. 3**).

Marker di attivazione immunitaria periferica e ciclo cellulare nel tempo

Per determinare una possibile correlazione tra il miglioramento della mucosa intestinale e la ridotta attivazione immunitaria sistemica sono stati misurati CD38 e HLA-DR sui linfociti CD4⁺ e CD8⁺; data la quantità limitata di LPL ottenuta dalle biopsie abbiamo valutato l'attivazione dei markers nei linfociti del sangue periferico.

Dopo 32 settimane di trattamento si è riscontrata una significativa diminuzione delle percentuali di CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺: i valori prima del trattamento erano compresi tra 10.2-31.8 %, con valore medio di 26.9%; dopo trattamento antiretrovirale i valori sono tra 2.1 e 27.6 %, con valore medio di 7.8% (calo medio di 15.9%, $p= 0.028$).

Le frequenze medie di CD4⁺CD38⁺HLA-DR⁺ era 11.5 prima e 6.4% dopo trattamento antiretrovirale (variazione media di 6.5%, $p<0.028$). E' stata osservata una correlazione inversa tra HLA-DR e CD38 sulle CD4⁺ e sulle CD4 delle cellule periferiche ($r: -0.857 p=0.014$ and $r=-0.790 p=0.020$ rispettivamente).

Abbiamo poi valutato la frazione di linfociti CD3⁺ CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ nel ciclo cellulare rilevando la proliferazione dell'antigene nucleare Ki-67.

Al T0 la frazione di linfociti **CD8⁺** positivi per Ki-67 nucleare aveva un range:1.1-14.2% con valore medio di 5.7%; dopo 32 settimane di terapia il range trovato era: 0.14-5.83% con un valore medio di 0.69% (una variazione media del 4.9%, p<0.03).

Al T0 la frazione di linfociti **CD4⁺** positivi per Ki-67 nucleare aveva un range: 1.27-6.56 con un valore medio di 3.02; dopo 32 settimane di terapia il range trovato era: 0.24%-2.55% con un valore medio di 1.12% (variazione media del 2.36%, p<0.03).

Correlazione tra recupero CD4 e aumento di IFN γ e IL-17

Abbiamo studiato la possibile associazione tra le frequenze delle cellule Th17 e Th1 CD4⁺ e l'aumento delle cellule CD4. Si è osservato un incremento del numero delle CD4 nel sangue periferico associato alla variazione delle frequenze CD4⁺ Th1 nel distretto periferico ($r=0.929, p<0.003$), ma non con le frequenze di CD4⁺Th17; la ripopolazione periferica delle cellule CD4 era direttamente correlata con le crescenti frequenze di CD4 Th1 nel distretto intestinale utilizzando antigeni specifici (SK: $r=0.857, p=0.007$; Ca: $r=0.762, p=0.008$) e la frequenza delle CD4⁺Th17 intestinali stimulate con SK($r=0.857, p=0.007$).

Al contrario un significativo incremento della percentuale di CD4 intestinale non era statisticamente associata al Th17 né con la percentuale di cellule Th1 in entrambi i distretti.

Correlazione tra la ricostituzione delle CD4 nel GALT e i markers di traslocazione microbica,attivazione immunitaria sistemica e proliferazione cellulare

È stata osservata una correlazione inversa tra il miglioramento in percentuale delle CD4⁺ e i cambiamenti dei livelli plasmatici di LPS; variazione dei livelli di LPS erano leggermente correlati con l'aumento di CD4 periferici ($r=-0.588, p=0.096$), ma nel complesso si è osservata una correlazione inversa con l'aumento di CD4 intestinale ($r=-0.700, p=0.036$), il che indica la stretta relazione tra la ricostituzione nel GALT e la traslocazione microbica.

Tuttavia, non riusciamo a trovare un'associazione tra l'incremento CD4⁺ Th17 dopo 32 settimane di terapia HAART e i marker di traslocazione microbica.

Abbiamo analizzato la relazione tra la diminuzione significativa dei marcatori di attivazione immunitaria nel sangue periferico e l'aumento in percentuale delle cellule CD4 e la variazione nelle frequenze delle cellule Th1 e Th17 nel sangue periferico e nella mucosa intestinale.

Nonostante l'associazione tra la variazione nella proliferazione (ki67) nelle cellule CD4 e CD8 T con i livelli plasmatici di HIV RNA ($r=0.71, p=0.071$ e $r=0.79, p=0.036$ rispettivamente), non abbiamo osservato qualsiasi altra associazione con Th17 periferico o intestinale e la ricostituzione delle Th1 o l'attivazione di marcatori solubili sistemici.

Analisi quantitativa delle cellule CD4⁺T e CD4⁺IL-17 prodotte nella mucosa intestinale

Per valutare ulteriormente gli effetti della terapia antiretrovirale nelle cellule CD4⁺T e Th17 intestinali, abbiamo effettuato un'analisi immunohistochimica su biopsie del colon inclusi in paraffina e fissati in formalina di 8 pazienti HIV⁺ prima (M0) e dopo sei mesi (M6) di HAART.

I vetrini sono stati analizzati tramite immunohistochimica semiquantitativa utilizzando un microscopio a luce (Olympus BX-41), che ci ha permesso di contare il numero delle cellule positive (ingrandimento 200X). I vetrini sono stati segnati come – (assenza di cellule); +(3-10 cellule positive); ++ (20-50 cellule positive); +++ (più di 50 cellule positive).

Immagine rappresentative delle cellule intestinali CD4 o IL-17 a tempo M0 e M6 vengono mostrate in **Figura 4a**. A ciascun campione è stato dato un punteggio crescente in base al numero di cellule positive analizzate in cinque differenti campi per preparato. Come mostrato in **Figura 4b**. Era evidente il recupero delle CD4⁺T a M6 in tre pazienti su otto, mentre in tre di essi il numero di CD4⁺T non subiva alcuna variazione rispetto a M0.

La terapia HAART era particolarmente efficace per il recupero delle cellule progenitrici di IL-17, con cinque pazienti su otto che mostravano alti livelli di IL-17⁺ a M6 rispetto a M0 (**Fig.4b**).

In particolare tutti e tre i pazienti con aumento di livelli di cellule CD4⁺T dopo sei mesi di HAART mostrano anche la ricostituzione delle cellule IL-17. Questi dati sono coerenti con un modello in cui la ricostituzione delle Th17 è un fattore

determinante la ricostituzione delle CD4⁺ e delle CD4⁺T totali e dell'immunità mucosale dopo HAART.

DISCUSSIONE

Per verificare se la HAART è in grado di ripristinare le cellule CD4⁺ T intestinali, abbiamo condotto uno studio longitudinale analizzando il fenotipo nelle cellule del sangue periferico e nelle biopsie ottenute dall'ileo, colon destro, colon sinistro e sigma. Negli anni passati il ruolo del tessuto intestinale è stato esplorato ma con risultati controversi. Per la difficoltà di eseguire il campionamento invasivo sequenziale nel colon, la maggior parte degli studi riguardano osservazioni fatte su campioni di retto, regione sigmoide o digiunale dell'intestino. Alcuni studi longitudinali e trasversali in pazienti HIV, dimostravano che la deplezione delle CD4 nella lamina propria nel tratto sigma o digiunale persisteva anche quando veniva iniziata la terapia HAART durante l'infezione primaria (Guadalupe et al., 2003 George et al 2005, Mehandru et al 2006; Trincati et al., 2009). Viceversa recenti studi trasversali hanno segnalato la possibilità di un buon recupero delle cellule CD4⁺T della mucosa intestinale (Sheth et al., 2008; Macal et al., 2008; Gordon et al., 2010).

Nel nostro studio abbiamo osservato che 32 settimane di terapia HAART possono indurre significativamente un'elevata ricostituzione di CD4⁺ nella mucosa intestinale, e che tale ricostituzione è maggiore nell'intestino rispetto al sangue periferico. Il buon recupero delle CD4 ottenuto in un breve periodo nel GALT può sostenere le conclusioni che l'uso precoce di terapia HAART migliora la ricostituzione nei pazienti infetti da HIV (Lok et al 2012).

In prima analisi abbiamo determinato le differenze nella distribuzione delle CD4⁺T nel distretto periferico e intestinale. La frequenza delle cellule CD4⁺ che produce IL-17 senza alcun stimolo era molto bassa nella maggior parte dei nostri

pazienti, sia in periferia, sia nel GALT. Questo non è sorprendente; le CD4⁺ Th17 sembrano essere il bersaglio privilegiato dell'infezione da HIV nel GALT (Brenchley et al., 2008), e il suo esaurimento avviene nella fase iniziale dell'infezione (Chege et al., 2011). La bassa percentuale di CD4⁺Th17 trovata nei PBMC dopo stimolo con PMA nei nostri pazienti naive era simile a quella trovata in uno studio precedente (Prendergast et al., 2010); mentre frequenze relativamente più alte delle CD4⁺Th17 sono state osservate nell'intestino rispetto al sangue periferico (Brenchley et al., 2008). Nei nostri pazienti naive è stata osservata una bassa frequenza di CD4⁺Th1 in entrambi i distretti, a conferma della compromissione delle Th1 in individui con HIV non trattati. Lo studio longitudinale ha reso possibile la valutazione e l'eventuale ricostituzione delle CD4⁺Th17 e CD4⁺Th1 dopo 32 settimane di HAART in pazienti naive. Nel sangue periferico non abbiamo trovato aumento significativo nelle frequenze di CD4⁺Th17 sia in PBMC non stimolati, sia in PBMC stimolati. Nell'intestino abbiamo trovato un lieve aumento di CD4⁺Th17 quando stimolate con PMA,SK e Ca, rispetto ai valori pre-HAART; l'aumento ha raggiunto una significatività statistica con stimolo Ca su LPL. Studi trasversali precedenti hanno riferito una diminuzione delle frequenze di CD4⁺Th17 nei PBMC e nel GALT in individui HIV con replicazione virale attiva (Brenchley et al., 2008; Salgado et al., 2011; Chege et al., 2011; Ciccone et al., 2011). Nel nostro studio riportiamo un parziale recupero delle CD4⁺Th17 nell'intestino dopo poco tempo dall'introduzione della HAART.

Tuttavia il parziale ripristino della popolazione CD4⁺Th17 non è stato associato ad un significativo ripopolamento delle cellule CD4⁺T. considerando che si possono osservare bassi livelli di replicazione virale anche dopo anni di HAART (Mehandru

et al., 2006; Guadalupe et al., 2006; Yukl et al., 2010), è ragionevole ipotizzare che sei mesi di terapia avrebbero potuto solo parzialmente sopprimere la replicazione virale attiva nell'intestino dei nostri pazienti.

La maggior espressione di INF γ era più coerente, in risposta a stimoli con SK si osserva un aumento in PBMC e GALT. Inoltre il parziale recupero delle CD4⁺Th1 è positivamente correlato con la ripopolazione CD4 nel sangue periferico, suggerendo che il ripopolamento delle Th1 potrebbe avvenire in tempi più brevi rispetto alle Th17. Le nostre osservazioni sulla ricostituzione CD4⁺ Th1-Th17 sono supportate da Mavigner e colleghi (Mavigner et al., 2012).

Successivamente abbiamo studiato altri marcatori, al fine di trovare una relazione diretta tra ripopolamento nel GALT delle CD4 e la diminuzione dell'attivazione immunitaria periferica. Nel nostro studio 32 settimane di terapia sono stati sufficienti per osservare una diminuzione significativa dei marker di attivazione del sistema immunitario, misurati da HLA-DR e CD38, e marker di proliferazione misurati con Ki67 in cellule CD4 e CD8. Anche 16sRNA batterica è risultata invariata dopo 32 settimane di terapia soppressiva virologica. Risultati simili sono stati trovati da Ciccone e colleghi (2011).

Ma valori normali sono stati raggiunti raramente (Brenchley et al., 2006; d'Etto et al., 2011), anche dopo un lungo periodo di HAART (Papasavvas et al., 2009; Jiang et al., 2009; Wallet et al., 2010, Merlini 2011; Baroncelli et al., 2011). Nel nostro studio abbiamo trovato una significativa associazione tra il recupero delle cellule CD4 nell'intestino e l'abbassamento parziale dei livelli di LPS nel sangue. Infine non abbiamo trovato alcuna associazione tra minore attivazione immunitaria sistemica e cambiamenti immunologici che avvengono nella mucosa intestinale.

La mancanza di correlazioni con la ricostituzione delle GALT potrebbe essere dovuto a molte ragioni: prima di tutto il breve periodo di terapia HAART, 32 settimane sono efficaci nella soppressione virale e nel miglioramento della risposta in periferia, ma probabilmente non abbastanza per permettere un ripopolamento specifico delle CD4 della mucosa intestinale, in cui l'efficacia della HAART sulla soppressione virologica potrebbe essere parziale, come già osservato da altri (Trincati et al.2009).

A sostegno di questa ipotesi abbiamo riscontrato una leggera associazione tra la lunghezza della HAART, tra le due colonscopie(da 22 a 46 settimane) e il recupero delle CD4 nell'intestino ($r=0.653$, $p=0.053$).

In secondo luogo il piccolo numero di pazienti analizzati avrebbe potuto limitare la capacità statistica per rilevare le differenze significative.

In conclusione, i risultati confermano la notevole incidenza della terapia HAART sull'immunità mucosale nell'intestino in pazienti HIV. Nonostante i limiti di questo studio, abbiamo dimostrato che 32 settimane di HAART inducono un significativo recupero delle cellule CD4⁺T nell'intestino e un parziale ripristino della sottopopolazione Th1 e Th17; la quantità di Cd4 della mucosa e il ripopolamento delle cellule T è stata associata con la riduzione di LPS ma ulteriori studi devono essere eseguiti per definire e distinguere le sottopopolazioni CD4 coinvolte nella ricostituzione e nel mantenimento dell'integrità della mucosa intestinale.

Table 1.

Patients characteristic are expressed as median, range and percentage

Patients characteristics	Values
Age (years)	41 (27 - 63)
Sex (% of males)	100
Caucasian (%)	100
CDC stage A, (n, %)	8 (88.9)
HIV diagnosis (years)	2 (0 - 5)
RNA zenith (log copies/ml)	4.58 (3.69 – 5.83)
CD4 nadir (cells/ μ l)	354 (145 – 519)
<i><u>Before HAART</u></i>	
HIV RNA(log copies/ml)	4.68 (3.60 – 5.83)
CD4 cells/ μ l	367 (145 – 720)
CD4 cells in blood (%)	16.0 (5.0 – 30.0)
CD4 cells in gut (%)	10.1 (4.0 - 16.1)
<i><u>After 6-months of HAART</u></i>	
HIV RNA(log copies/ml)	1.57 (1.57 – 2.28)
CD4 cells/ μ l	472 (241 – 591)
CD4 cells in blood (%)	23.0 (7.0 - 38.0)
CD4 cells in gut (%)	27.3 (9.2 - 41.0)

Fig. 1

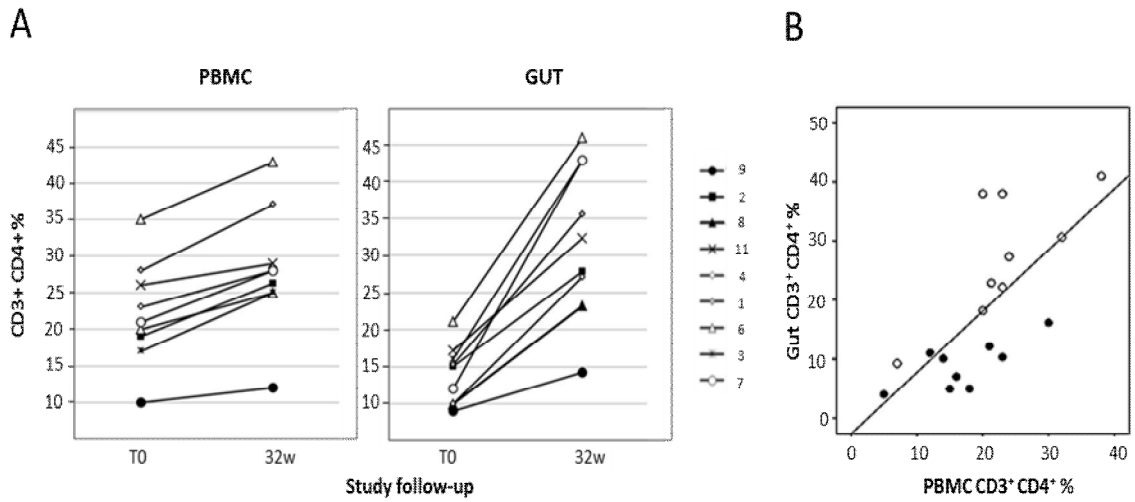


Figure 1. A Percentage of CD4 cells in peripheral blood and in gut at the beginning and after 6 months of HAART. **B** Correlation ($r= 0.759$, $p<0.001$) between CD4 cell percentage in peripheral blood and in gut at baseline (black) and after 32 weeks of therapy (white).

Fig.

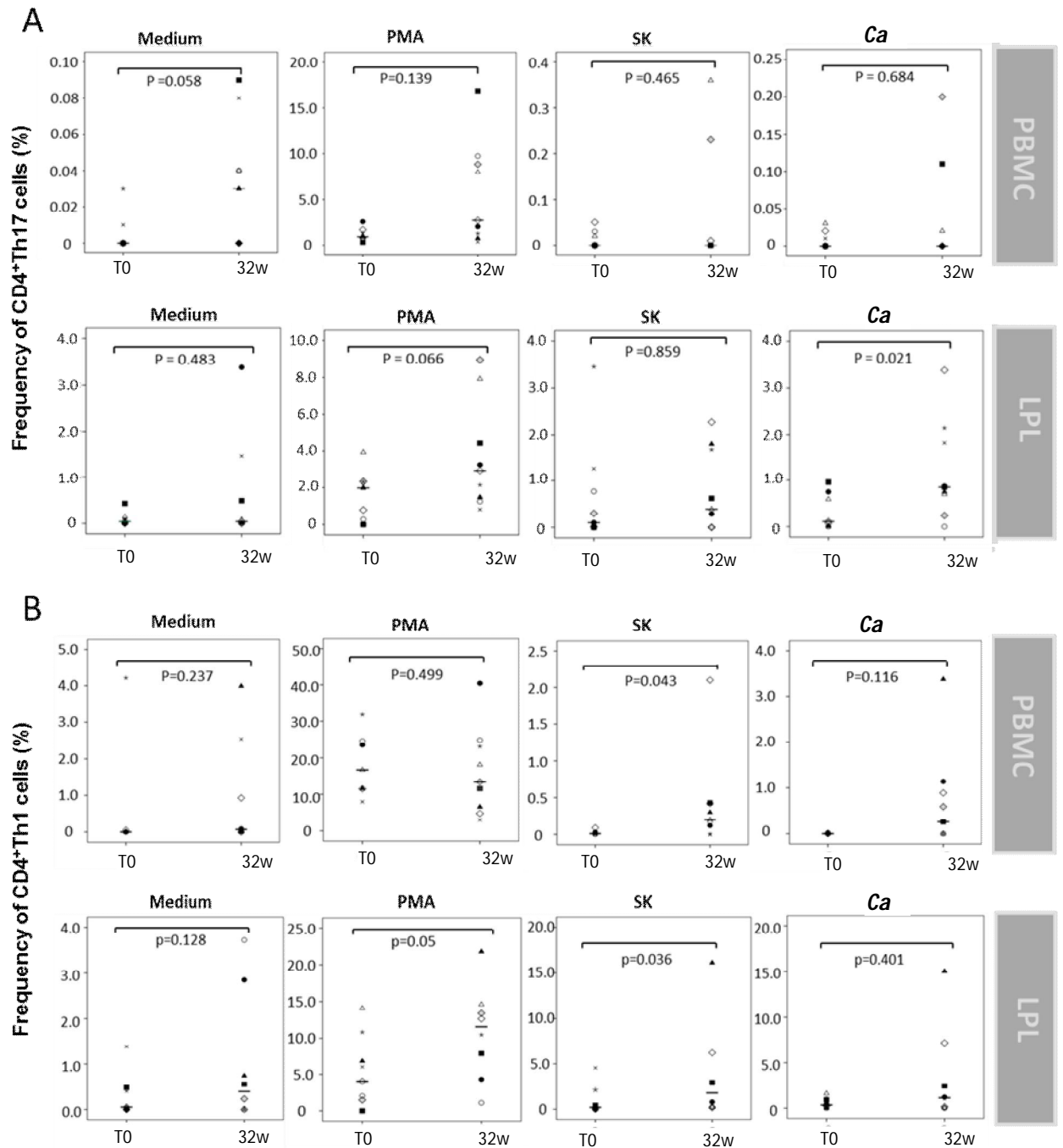


Figure 2. Frequencies of CD4⁺Th17 cells (A) and CD4⁺IFN γ (B) in PBMC and LPL after overnight stimulation without (medium) and with PMA (3 ng/ml), Streptokinase (10 μ g/ml) and *Candida albicans* (10 μ g/ml) before (T=0) and after 32 weeks of HAART (32w). Each symbols represents a single patients.

Fig.3

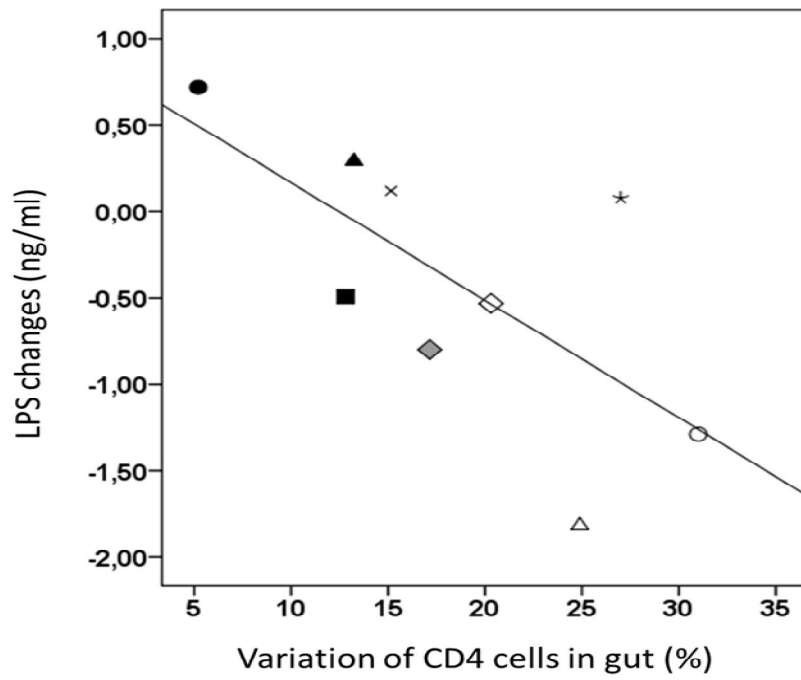


Figure 3. Correlation between changes in CD4 cells percentage in gut and variation in lipopolysaccharid plasma levels in 32 weekss of HAART ($r = -0.800$, $p = 0.036$)

Figure 4a

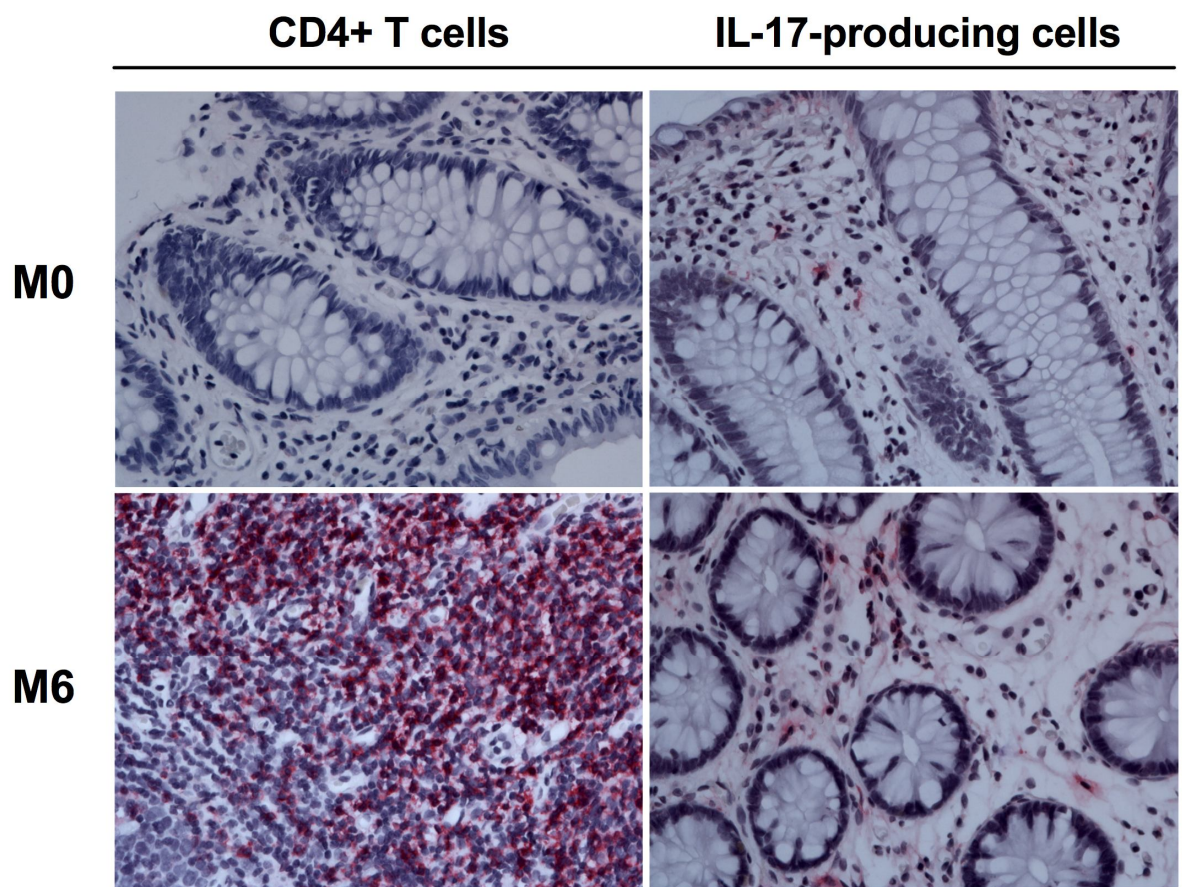


Figure 4b

<u>SAMPLE CODE</u>	<u>Tissue</u>	<u>PAT CODE</u>	<u>FOLLOW UP</u>	<u>IL-17+ cells (Vector red)</u>	<u>CD4 cells (Vector red)</u>
21603/09 L3	Colon	2RR	M0	+	+
13285/10/L3	Colon	2RR	M6	++	+++
23084/09 L4	Sigma	6ZA	M0	+	-
13456/10 L4	Sigma	6ZA	M6	+++	+
21604/09 L3	Colon	1MS	M0	+	++
13284/10 L3	Colon	1MS	M6	++	+++
22321/09 L3	Colon	3GM	M0	+	++
20898/10 L3	Colon	3GM	M6	++	++
23083/09 L3	Colon	4GV	M0	+	++
14382/10 L3	Colon	4GV	M6	++	++
14380/10 L3	Colon	11ES	M0	+	++
2501/10 L3	Colon	11ES	M6	+	++
3144/10 L3	Colon	7GP	M0	++	+++
18883/10 L3	Colon	7GP	M6	++	++
1241/10 L3	Colon	9PO	M0	+++	+++
13458/10 L3	Colon	9PO	M6	++	++

Score range (quantification performed in 5 fields):

(-) --> No positive cells; (+) --> 3-10 positive cells; (++) --> 20-30 positive cells; (+++) --> more than 50 positive cells.

BIBLIOGRAFIA

Baroncelli S, Galluzzo CM, Pirillo MF, Mancini MG, Weimer LE, Andreotti M, Amici R, Vella S, Giuliano M, Palmisano L. Microbial translocation is associated with residual viral replication in HAART-treated HIV+ subjects with <50copies/ml HIV-1 RNA. *J Clin Virol*. 2009 Dec;46(4):367-70.

Bhaskaran K, Hamouda O, Sannes M, et al. Changes in the risk of death after HIV seroconversion compared with mortality in the general population. *Jama* 2008;300:51.

Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006 Dec;12(12):1365-71.

Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe?. *Nat Immunol*. 2006 Mar;7(3):235-9.

Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, Asher TE, Scheinberg P, Price DA, Hage CA, Kholi LM, Khoruts A, Frank I, Else J, Schacker T, Silvestri G, Douek DC. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood*. 2008 Oct 1;112(7):2826-35.

Brinig MM, Lepp PW, Ouverney CC, Armitage GC, Relman DA. Prevalence of bacteria of division TM7 in human subgingival plaque and their association with disease. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:1687-94.

Cecchinato V, Trindade CJ, Laurence A, Heraud JM, Brenchley JM, Ferrari MG, Zaffiri L, Trynieszewska E, Tsai WP, Vaccari M, Parks RW, Venzon D, Douek DC, O'Shea JJ, Franchini G. Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Mucosal Immunol*. 2008 Jul;1(4):279-88.

Chege D, Sheth PM, Kain T, Kim CJ, Kovacs C, Loutfy M, Halpenny R, Kandel G, Chun TW, Ostrowski M, Kaul R; the Toronto Mucosal Immunology Group. Sigmoid Th17 populations, the HIV latent reservoir, and microbial translocation in men on long-term antiretroviral therapy. *AIDS*. 2011 Mar 27;25(6):741-749.

Cicccone EJ, Greenwald JH, Lee PI, Biancotto A, Read SW, Yao MA, Hodge JN, Thompson WL, Kovacs SB, Chairez CL, Migueles SA, Kovacs JA, Margolis LB, Sereti I. CD4+ T Cells, Including Th17 and Cycling Subsets, Are Intact in the Gut Mucosa of HIV-1-Infected Long-Term Nonprogressors. *J Virol*. 2011 Jun;85(12):5880-8.

Collaboration TATC. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *The Lancet* 2008;372:293– 299.

Deeks SG, Phillips AN. HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. *Bmj* 2009;338:a3172.

d'Ettorre G, Paiardini M, Zaffiri L, Andreotti M, Ceccarelli G, Rizza C, Indinnimeo M, Vella S, Mastroianni CM, Silvestri G, Vullo V. HIV persistence in the gut mucosa of HIV-infected subjects undergoing antiretroviral therapy correlates with immune activation and increased levels of LPS. *Curr HIV Res.* 2011 Apr;9(3):148-53.

El Hed A, Khaitan A, Kozhaya L, Manel N, Daskalakis D, Borkowsky W, Valentine F, Littman DR, Unutmaz D. Susceptibility of human Th17 cells to human immunodeficiency virus and their perturbation during infection. *J Infect Dis.* 2010 Mar 15;201(6):843-54.

Gaardbo JC, Hartling HJ, Gerstoft J, Nielsen SD. Incomplete immune recovery in HIV infection: mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:670957.

Gordon SN, Cervasi B, Odorizzi P, Silverman R, Abera F, Ginsberg G, Estes JD, Paiardini M, Frank I, Silvestri G. Disruption of intestinal CD4+ T cell homeostasis is a key marker of systemic CD4+ T cell activation in HIV-infected individuals. *J Immunol.* 2010 Nov 1;185(9):5169-79.

George MD, Reay E, Sankaran S, Dandekar S. Early antiretroviral therapy for simian immunodeficiency virus infection leads to mucosal CD4+ T-cell restoration and enhanced gene expression regulating mucosal repair and regeneration. *J Virol.* Mar 2005;79(5):2709-2719.

Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, Dandekar S. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 2003 Nov;77(21):11708-17.

Guadalupe M, Sankaran S, George MD, Reay E, Verhoeven D, Shacklett BL, Flamm J, Wegelin J, Prindiville T, Dandekar S. Viral suppression and immune restoration in the gastrointestinal mucosa of human immunodeficiency virus type 1-infected patients initiating therapy during primary or chronic infection. *J Virol.* 2006 Aug;80(16):8236-47.

Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, Landay A, Martin J, Sinclair E, Asher AI, Deeks SG, Douek DC, Brenchley JM. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis.* 2009 Apr 15;199(8):1177-85.

Kuller LH, Tracy R, Belloso W, et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med* 2008;5:e203.

Lok JJ, Degruittola V. Impact of Time to Start Treatment Following Infection with Application to Initiating HAART in HIV-Positive Patients. *Biometrics*. 2012 Feb 21. [Epub ahead of print]

Macal M, Sankaran S, Chun TW, Reay E, Flamm J, Prindiville TJ, Dandekar S. Effective CD4+ T-cell restoration in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected patients is associated with enhanced Th17 cells and polyfunctional HIV-specific T-cell responses. *Mucosal Immunol*. 2008 Nov;1(6):475-88.

Mavigner M, Cazabat M, Dubois M, L'Faqihi FE, Requena M, Pasquier C, Klopp P, Amar J, Alric L, Barange K, Vinel JP, Marchou B, Massip P, Izopet J, Delobel P. Altered CD4+ T cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals. *J Clin Invest*. 2012 Jan 3;122(1):62-9.

Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Jean-Pierre P, Manuelli V, Lopez P, Shet A, Low A, Mohri H, Boden D, Racz P, Markowitz M. Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS Med*. 2006 Dec;3(12):e484.

Merlini E, Bai F, Bellistri GM, Tincati C, d'Arminio Monforte A, Marchetti G. Evidence for polymicrobial flora translocating in peripheral blood of HIV-infected patients with poor immune response to antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2011 Apr 11;6(4):e18580.

Papasavvas E, Pistilli M, Reynolds G, Bucki R, Azzoni L, Chehimi J, Janmey PA, DiNubile MJ, Ondercin J, Kostman JR, Mounzer KC, Montaner LJ. Delayed loss of control of plasma lipopolysaccharide levels after therapy interruption in chronically HIV-1-infected patients. *AIDS*. 2009 Jan 28;23(3):369-75.

Piconi S, Trabattoni D, Gori A, Parisotto S, Magni C, Meraviglia P, Bandera A, Capetti A, Rizzardini G, Clerici M. Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4+ T-cell counts during antiretroviral therapy. *AIDS*. 2010 Aug 24;24(13):1991-2000.

Pinzone MR, Di Rosa M, Cacopardo B, Nunnari G. HIV RNA suppression and immune restoration: can we do better? *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:515962.

Prendergast A, Prado JG, Kang YH, Chen F, Riddell LA, Luzzi G, Goulder P, Klenerman P. HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. *AIDS*. 2010 Feb 20;24(4):491-502.

Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, Godinez I, Sankaran S, Paixao TA, Gordon MA, Kolls JK, Dandekar S, Bäumlner AJ. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency

promotes Salmonella dissemination from the gut. *Nat Med*. 2008 Apr;14(4):421-8.

Salgado M, Rallón NI, Rodés B, López M, Soriano V, Benito JM. Long-term non-progressors display a greater number of Th17 cells than HIV-infected typical progressors. *Clin Immunol*. 2011 May;139(2):110-4.

Sheth PM, Chege D, Shin LY, Huibner S, Yue FY, Loutfy M, Halpenny R, Persad D, Kovacs C, Chun TW, Kandel G, Ostrowski M, Kaul R. Immune reconstitution in the sigmoid colon after long-term HIV therapy. *Mucosal Immunol*. 2008 Sep;1(5):382-8.

Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol*. 2007 Jun;19(3):281-6. Epub 2007 Apr 12. Review.

Tincati C, Biasin M, Bandera A, Violin M, Marchetti G, Piacentini L, Vago GL, Balotta C, Moroni M, Franzetti F, Clerici M, Gori A. Early initiation of highly active antiretroviral therapy fails to reverse immunovirological abnormalities in gut-associated lymphoid tissue induced by acute HIV infection. *Antivir Ther*. 2009;14(3):321-30.

Yuki SA, Gianella S, Sinclair E, Epling L, Li Q, Duan L, Choi AL, Girling V, Ho T, Li P, Fujimoto K, Lampiris H, Hare CB, Pandori M, Haase AT, Günthard HF, Fischer M, Shergill AK, McQuaid K, Havlir DV, Wong JK. Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV-positive patients receiving suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2010 Nov 15;202(10):1553-61.

Wallet MA, Rodriguez CA, Yin L, Saporta S, Chinratanapisit S, Hou W, Sleasman JW, Goodenow MM. Microbial translocation induces persistent macrophage activation unrelated to HIV-1 levels or T-cell activation following therapy. *AIDS*. 2010 Jun 1;24(9):1281-90.

Wolk K, Witte E, Hoffmann U, Doecke WD, Endesfelder S, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, Wittig BM, Sabat R. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol*. 2007 May 1;178(9):5