



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
"SCIENZE MEDICHE"
CICLO XXXII**

**ANTIOSSIDANTI MITOCONDRIALI E COMPOSTI
POLIFENOLICI NELL'EPATITE CRONICA B: POSSIBILI
CANDIDATI PER IMMUNOTERAPIE INNOVATIVE
BASATE SUL RIPRISTINO DELLA FUNZIONE ANTIVIRALE
DEI LINFOCITI T CD8+ HBV-SPECIFICI**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. **CARLO FERRARI**

Tutore:

Chiar.mo Prof. **CARLO FERRARI**

Dottoranda: **GRETA ACERBI**

Anni 2016/2019

SOMMARIO

RIASSUNTO	3
ABSTRACT	5
INTRODUZIONE	7
1. Caratteristiche biologiche del virus dell'epatite B	7
1.1 Morfologia delle particelle virali e struttura del genoma	7
1.2 Ciclo replicativo	9
1.3 Genotipi virali	11
2. Epidemiologia e storia naturale dell'infezione da HBV	13
2.1 Epidemiologia dell'epatite da virus B.....	13
2.2 Storia naturale dell'infezione	14
3. Cenni di terapia antivirale	19
3.1 Interferoni	20
3.2 Analoghi nucleos(t)idici	20
3.3 Nuove strategie terapeutiche	22
4. Immunopatogenesi dell'infezione da virus dell'epatite B	25
5. Esaurimento funzionale dei linfociti T nell'infezione cronica da HBV	30
6. Dati preliminari.....	33
6.1 Analisi dei profili trascrizionali dei linfociti T HBV-specifici funzionalmente esauriti	33
6.2 Validazione della disfunzione mitocondriale e del proteasoma nei linfociti HBV-	
specifici di pazienti con epatite cronica B.	36
6.3 Ripristino funzionale linfocitario mediante trattamento con composti antiossidanti	
specifici per il mitocondrio	39
7. Funzioni di mitocondrio e proteasoma nei linfociti T e loro interazioni.....	42
8. Composti polifenolici impiegati per lo studio	44
SCOPO DELLO STUDIO	49
MATERIALI E METODI	51
1. Pazienti e controlli.....	51
2. Peptidi sintetici, complessi destramerici peptide-HLA di classe I e anticorpi.....	52

3. Isolamento dei linfociti del sangue periferico.....	54
4. Studio dell'autofagia mediante citometria a flusso	54
5. Espansione e trattamento dei linfociti T in vitro.....	55
6. Blocco del legame PD-1/PD-L1.....	56
7. Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale.....	57
8. Valutazione delle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) citoplasmatiche.....	58
9. Quantificazione degli aggregati proteici intracellulari	59
10. Valutazione della degranulazione e della produzione di citochine intracellulari (ICS)..	59
11. Analisi statistiche.....	60
RISULTATI	61
1. I linfociti T HBV-specifici di pazienti con infezione cronica presentano un processo di autofagia alterato.....	61
2. Il trattamento con Resveratrolo e Oleuropeina migliora le funzioni mitocondriali e del proteasoma dei linfociti “ <i>exhausted</i> ”	64
3. Recupero della funzione antivirale dei linfociti T HBV-specifici di pazienti con infezione cronica, in seguito al trattamento con i composti polifenolici	68
4. Confronto tra differenti composti impiegati per il ripristino della funzione antivirale dei linfociti T di pazienti con infezione cronica da HBV	72
5. Recupero della funzione antivirale dei linfociti T HBV-specifici in seguito al trattamento con i metaboliti dei composti polifenolici.....	73
6. L'efficacia del trattamento con gli antiossidanti MitoQ e MitoTempo aumenta se essi vengono associati ai composti polifenolici	77
7. Specificità degli effetti del trattamento con le associazioni tra antiossidanti e composti polifenolici per i linfociti T HBV-specifici funzionalmente esauriti	82
8. Effetto del trattamento con le associazioni tra antiossidanti e polifenoli su linfociti T CD8+ HBV-specifici con differenti specificità antigeniche	84
DISCUSSIONE	86
BIBLIOGRAFIA	95

RIASSUNTO

Il virus dell'epatite B (HBV) è la causa più frequente al mondo di infezioni croniche epatiche e rappresenta un prioritario problema di salute pubblica a livello globale. In corso di infezione cronica da HBV i linfociti T virus-specifici sono scarsamente responsivi alla stimolazione antigenica e funzionalmente compromessi. Si ritiene che l'esaurimento funzionale (o *exhaustion*) linfocitario sia primariamente causato dalla persistente esposizione ad alte cariche antigeniche virali e che tale inibizione contribuisca alla persistenza virale. La ricostituzione di una risposta antivirale efficiente può pertanto rappresentare una strategia razionale per il trattamento dei pazienti con infezione cronica da HBV e per il potenziamento delle terapie antivirali disponibili. Attualmente, il trattamento dell'infezione cronica da HBV è principalmente basato sulla terapia con analoghi nucleos(t)idici (NUC), che nella maggior parte dei pazienti deve tuttavia essere somministrata per tutta la vita per il rischio di pericolose riattivazioni virali alla sospensione del trattamento. Esiste pertanto un'urgente necessità di approcci terapeutici che accelerino il controllo virale completo, al fine di abbreviare la durata della terapia con NUC. Sulla base dei dati disponibili in letteratura e ottenuti per lo più in modelli animali di infezione cronica sostenuta da virus differenti da HBV, si è tentato di ripristinare la funzionalità T linfocitaria in vitro in pazienti con epatite cronica B tramite il blocco di specifici meccanismi inibitori *up-regolati* in questi pazienti. Tali strategie sono risultate però efficaci solo in una parte dei pazienti trattati e, nei casi in cui è stato osservato, il recupero funzionale dei linfociti T è risultato sempre parziale. Al fine di identificare bersagli molecolari più idonei per strategie di ripristino della funzione linfocitaria, è stato eseguito uno studio di trascrittomica dei linfociti T virus-specifici isolati da pazienti con epatite cronica B, che ha evidenziato la prevalente *down-regolazione* di geni

coinvolti in varie funzioni cellulari, tra cui particolarmente significativa quella relativa ai processi mitocondriali e di proteostasi cellulare. Studi *in vitro* eseguiti trattando i linfociti T di pazienti con infezione cronica da HBV con composti ad azione antiossidante specifica per l'ambiente mitocondriale (MitoQ e MitoTempo) hanno permesso di ottenere un incremento significativo delle funzioni antivirali dei linfociti virus-specifici "*exhausted*". Con l'obiettivo di identificare composti biologicamente attivi che possano agire simultaneamente sui *pathways* intracellulari risultati alterati nei linfociti HBV-specifici *exhausted*, è stata testata *in vitro* l'efficacia di due composti polifenolici di origine naturale, Resveratrolo ed Oleuropeina. Tali trattamenti hanno indotto un significativo miglioramento sia della funzionalità mitocondriale che della proteostasi. Inoltre, i polifenoli, ma anche le molecole derivate dal loro metabolismo (metaboliti di Resveratrolo e di Idrossitirosolo) hanno permesso di migliorare significativamente la funzione antivirale dei linfociti T HBV-specifici isolati da pazienti con infezione cronica da HBV, a supporto di un loro possibile utilizzo *in vivo*. Data la possibile complementarità di azione tra composti polifenolici ed antiossidanti mitocondriali, è stata valutata anche l'efficacia delle associazioni tra MitoQ e MitoTempo con Oleuropeina e Resveratrolo. Tali trattamenti hanno indotto un incremento significativo della funzione antivirale in un numero maggiore di pazienti rispetto a quello osservato sia con i singoli composti, sia con il blocco del *checkpoint* inibitorio PD1. I risultati di tale studio suggeriscono che il trattamento combinato di antiossidanti mitocondriali e composti polifenolici rappresenta una strategia promettente nella prospettiva di individuare nuove terapie immunomodulanti per l'epatite cronica B, da utilizzare singolarmente o in combinazione con le terapie antivirali attualmente disponibili.

ABSTRACT

The hepatitis B virus (HBV) is the most frequent cause of chronic liver infection and represents an important global public health problem. In chronic HBV infection, virus-specific T cells are hypo-responsive to antigen stimulation and functionally defective. This functional inhibition (T cell *exhaustion*) is believed to be primarily caused by persistent exposure of T cells to high antigen loads and to contribute to virus persistence. Reconstitution of an efficient anti-viral T cell response may thus represent a rational strategy to treat chronic HBV patients and to complement the effect of available anti-viral therapies. At present, treatment of chronic HBV infection is mainly based on nucleos(t)ide analogue (NUC) therapy, which must be life-long in most patients because of the risk of severe virus reactivations at therapy withdrawal. Therefore, there is an urgent need of novel treatments to shorten the duration of NUC therapy by accelerating virus control. Based on available data derived from animal models of chronic viral infection, blockade of overexpressed inhibitory *pathways* was tested in chronic HBV infection to restore the T cell function, but its efficacy has only been partial. In order to identify optimal molecular targets for a more efficient functional T cell restoration, a systematic transcriptome analysis of virus-specific T cells isolated from chronic HBV patients was previously performed, highlighting the prevalent down-regulation of genes involved in many biological functions, including a deep deregulation of several mitochondrial and proteostasis *pathways*. *In vitro* treatment of HBV-specific T cells isolated from chronic patients with the mitochondria-targeted antioxidants MitoQ and MitoTempo significantly improved the anti-viral function of exhausted T cells. In order to identify optimal molecular targets for functional T cell restoration, we tested two polyphenolic compounds, Resveratrol and Oleuropein. These treatments led to a significant

improvement in both mitochondrial and proteostasis functions. Moreover, the polyphenols, but also their metabolites (metabolites of Resveratrol and Hydroxytyrosol) improved the anti-viral function of HBV-specific T cells, supporting a potential effect of these compounds *in vivo*. Based on the potential synergistic effect of mitochondria-targeted antioxidants and polyphenolic compounds, we tested the efficacy of Resveratrol and Oleuropein in association with MitoQ and MitoTempo. These combined treatments significantly improved the antiviral T cell function in a greater number of patients, as compared with individual compounds and with PD1 checkpoint blockade. Polyphenols in association with mitochondria-targeted antioxidants thus represent potential candidates for novel immune reconstitution strategies in chronic HBV infection, alone or in combination with available antiviral therapies.

INTRODUZIONE

1. Caratteristiche biologiche del virus dell'epatite B

1.1 Morfologia delle particelle virali e struttura del genoma

Il virus dell'epatite B (HBV) è un virus a DNA appartenente alla famiglia Hepadnaviridae, che comprende virus con specifico tropismo per il tessuto epatico. In microscopia elettronica, il virione di HBV appare come una piccola particella sferica, di circa 42 nm di diametro (particella di Dane), costituita da un envelope esterno di natura lipoproteica e da un nucleocapside interno di natura proteica e a simmetria icosaedrica che racchiude il genoma virale e la DNA polimerasi virus-specifica. Nel siero dei pazienti affetti da epatite B si osservano, oltre ai virioni maturi, anche particelle subvirali incomplete che hanno forma sferica o filamentosa con un diametro di 20-22 nm (**Figure 1A e B**). Queste ultime hanno proprietà immunogeniche ma non sono infettanti in quanto prive dell'acido nucleico virale; solo il virus completo (particella di Dane) è infettante^{1,2}.

Il genoma di HBV è costituito da una molecola di DNA circolare parzialmente a doppio filamento: risulta formato da un filamento breve S (short) a polarità positiva ed un filamento L (long) a polarità negativa. Il filamento L ha una lunghezza di circa 3200 nucleotidi mentre il filamento S ha una lunghezza variabile tra il 50 e il 100% del filamento lungo.

L'analisi della sequenza nucleotidica del genoma di HBV ha evidenziato la presenza di quattro Open Reading Frames (ORFs) parzialmente sovrapposte che codificano per le proteine strutturali e non strutturali del virione: S, C, P e X (**Figura 1C**).

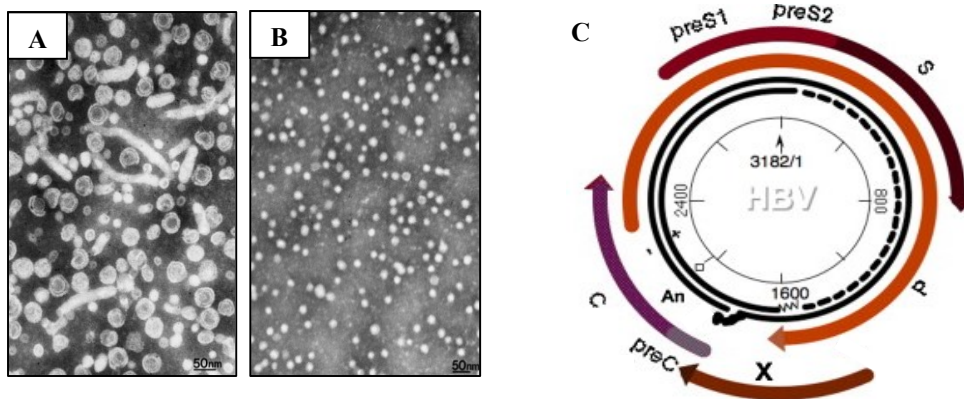


Figura 1. Particelle virali di HBV e struttura del genoma.

Nei pannelli A e B è riportata la morfologia delle particelle virali isolate dal siero di un paziente portatore del virus dell'epatite B e visualizzate mediante microscopia elettronica: il pannello A mostra i virioni completi e le particelle subvirali a forma filamentosa, il pannello B mostra le particelle subvirali a forma sferica.

Il pannello C mostra la struttura del genoma di HBV: nella parte più interna sono riportati i filamenti di DNA, esternamente sono rappresentate, attraverso frecce colorate, le differenti regioni del genoma di HBV codificanti per le proteine strutturali e non strutturali del virus.

Il gene S è affiancato da due regioni, pre-S1 e pre-S2; queste regioni codificano per tre antigeni virali di superficie presenti nell'envelope, distinti in base al punto d'inizio della traduzione genica (proteina grande, media e piccola).

La proteina piccola, più comunemente denominata proteina S (small) o HBsAg, è codificata dal gene S ed è presente, nel siero dei pazienti, in largo eccesso rispetto alle altre proteine dell'envelope. L'antigene HBsAg appare molto precocemente nel siero dei soggetti infettati, costituendo il primo marker sierologico dell'infezione. La proteina media M (middle) è codificata dal gene pre-S2 e dal gene S; la proteina grande L (large) è codificata dalle regioni pre-S1, pre-S2 e S. Tutte e tre le proteine di superficie contengono, pertanto, una sequenza comune codificata dal gene S. Tale sequenza è altamente immunogenica.

Le regioni C e pre-C codificano per l'antigene del core (HBcAg), che costituisce la proteina strutturale del capsido del virus, e per l'antigene E (HBeAg), proteina non strutturale che

viene secreta nel siero del soggetto infettato e rappresenta un marcatore di attiva replicazione virale.

La regione P, o gene *PoI*, costituisce l'80% del genoma di HBV e codifica per la DNA polimerasi virale, un enzima multifunzionale capace di svolgere sia la funzione di trascrittasi inversa che quella di ribonucleasi (RNAsiH).

Il gene X codifica per una proteina non strutturale: HBx. Quest'ultima sembra avere una funzione regolatrice, esprimendo una proprietà transattivante nei confronti di altre proteine virali e di geni cellulari. Inoltre HBx sembra svolgere un ruolo importante nel processo di epatocarcinogenesi³.

1.2 Ciclo replicativo

Il ciclo replicativo di HBV, così come quello di tutti gli Hepadnavirus, prevede l'utilizzo di un intermedio a RNA che funge da stampo per l'attività della trascrittasi inversa, sul quale viene sintetizzato il DNA corrispondente (**Figura 2**). Il ciclo replicativo inizia con il riconoscimento da parte del virus di un recettore presente sulla membrana degli epatociti; tale recettore è rimasto per molti anni sconosciuto. Nel 2012 è stato identificato il co-trasportatore taurocolato sodio-dipendente (NTCP), polipeptide di membrana principalmente espresso sulle cellule epatiche, come recettore specifico per il dominio pre-S1 della proteina di superficie L di HBV.⁴ In seguito a questa specifica interazione, l'envelope del virione e la membrana cellulare dell'epatocita si fondono e il nucleocapside virale è trasportato all'interno della cellula mediante endocitosi. Il genoma virale, liberato dal capsido grazie all'azione di enzimi lisosomiali, raggiunge successivamente il nucleo della cellula ospite. Il primo evento che ha luogo nel nucleo dell'epatocita infettato è la conversione del DNA virale parzialmente a doppio filamento, definito RC-DNA (relaxed circular DNA), in DNA circolare

covalentemente chiuso o ccc-DNA (covalently closed circular DNA); per fare ciò il virus si avvale di enzimi cellulari presenti nel nucleo della cellula ospite. Il ccc-DNA funge da stampo per la sintesi di trascritti genomici e subgenomici da parte della RNA polimerasi DNA-dipendente cellulare. Questi trascritti vengono successivamente trasportati a livello citoplasmatico, dove verranno utilizzati per la sintesi delle proteine strutturali e non strutturali che serviranno per l'assemblaggio dei nuovi virioni. La sintesi di nuovo DNA virale si realizza a partire da alcuni trascritti, che svolgono la funzione di RNA pregenomico. Questo RNA viene incorporato, insieme alla proteina Pol, all'interno di proteine del *core* assemblatesi a formare il nucleocapside. All'interno del nucleocapside, un singolo filamento di RNA pregenomico viene retrotrascritto in un filamento di DNA genomico a polarità negativa. Non appena quest'ultimo si è formato, vi è la degradazione dell'RNA ad opera di una RnaseH. Successivamente la polimerasi virale sintetizza il filamento a polarità positiva utilizzando quello a polarità negativa come stampo. Il ciclo replicativo del virus termina con l'assemblaggio dell'envelope esterno a livello del reticolo endoplasmatico; a questo punto il virione maturo è pronto per uscire dalla cellula epatica³.

Questo meccanismo complesso di replicazione virale, unito al fatto che il virus può persistere per decenni nell'organismo di un soggetto con infezione cronica, permette di comprendere come singole mutazioni, sia spontanee (insorte durante la replicazione virale) sia indotte dalla pressione immunologica dell'ospite, possano nel tempo sommarsi e consentire l'emergere di ceppi virali genotipicamente diversi dal ceppo infettante originario.

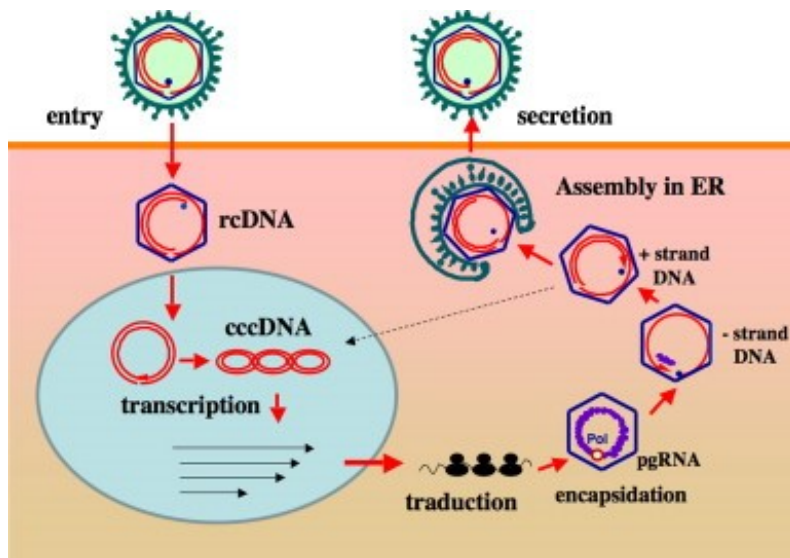


Figura 2. Illustrazione schematica del ciclo replicativo di HBV.

1.3 Genotipi virali

Il sequenziamento del DNA genomico del virus dell'epatite B ha permesso di evidenziare la presenza di differenti genotipi virali nel mondo con una distribuzione che varia a seconda delle diverse aree geografiche (**Figura 3**). Sono stati identificati dieci genotipi virali classificati da A a J e numerosi subgenotipi, con differenze nella sequenza nucleotidica maggiori dell'8% per i genotipi e tra il 4 e l'8% per i subgenotipi⁵. I genotipi da A a H sono quelli maggiormente noti e meglio caratterizzati. Il genotipo A è più diffuso nel Nord Est dell'Europa, Nord America, India e Africa; i genotipi B e C si trovano principalmente in Asia; il genotipo D è diffuso in Europa meridionale, India e Africa; il genotipo E è limitato all'Africa Sub-Sahariana; i genotipi F e H sono diffusi principalmente nelle Americhe; il genotipo G è stato riscontrato in Francia, Germania e negli Stati Uniti, ma la sua origine geografica rimane tuttora sconosciuta⁵. Successivamente è stato identificato il genotipo I, principalmente diffuso in

Vietnam e Laos, e il genotipo J, isolato in un paziente giapponese affetto da carcinoma epatocellulare. Quest'ultimo genotipo mostra una divergenza di sequenza dal 10.7 al 15.7% rispetto agli altri genotipi noti⁵⁻⁷.

A seconda della tipologia di genotipo di HBV è possibile riscontrare delle differenze nella progressione dell'infezione e nella risposta del paziente infettato al trattamento antivirale. Per esempio, il genotipo A mostra una maggiore tendenza a cronicizzare; i genotipi C e D mostrano una maggiore frequenza di progressione verso la cirrosi e l'epatocarcinoma⁵.

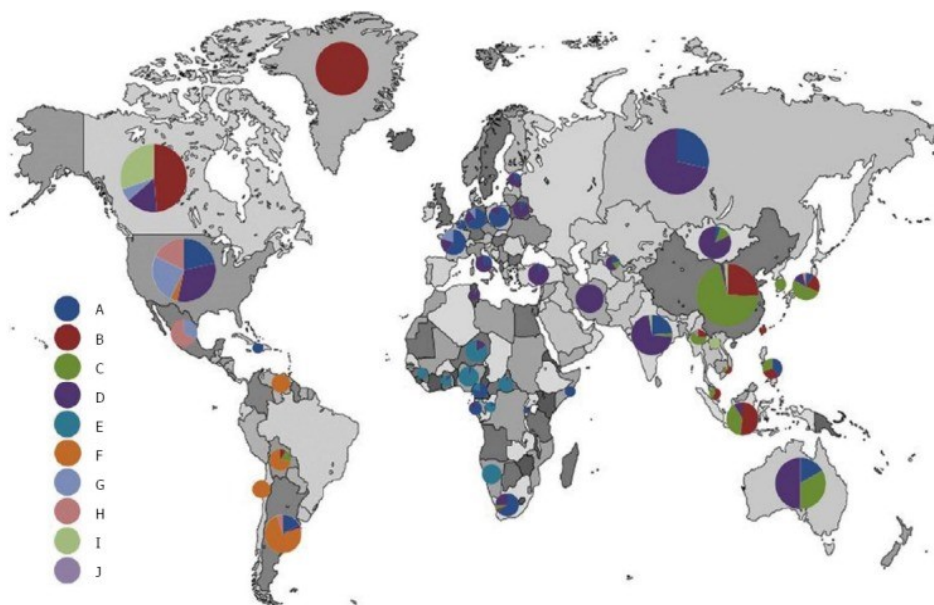


Figura 3. Distribuzione geografica dei genotipi del virus dell'epatite B nel mondo.

Fonte: Sanbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance.

World Journal of Gastroenterology. 2014; 20(18): 5427-5434.

2. Epidemiologia e storia naturale dell'infezione da HBV

2.1 Epidemiologia dell'epatite da virus B

Il virus dell'epatite B è il più comune virus epatico responsabile di infezioni croniche che colpiscono l'uomo e rappresenta pertanto un problema di salute pubblica a livello globale. Secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, tra la popolazione mondiale più di 2 miliardi di individui hanno contratto l'infezione da HBV e tra questi più di 350 milioni sono affetti da epatite B cronica. L'epatite cronica causata da infezione da HBV risulta essere tra le principali cause di cirrosi ed epatocarcinoma, sono stati stimati circa 780 mila decessi ogni anno causati da complicazioni del danno epatico conseguente all'infezione⁸.

L'incidenza dell'infezione da HBV e le modalità di trasmissione variano molto a livello mondiale, a seconda delle diverse aree geografiche.⁹ Si possono distinguere regioni ad alta, intermedia e bassa endemia (**Figura 4**).

Le regioni ad alta endemia, dove la prevalenza dell'infezione è pari o superiore all'8%, corrispondono principalmente ad Africa Sub-Sahariana e Sud-Est Asiatico; le regioni ad endemia intermedia, con prevalenza di HBsAg tra 2-7%, sono soprattutto India e paesi del Medio Oriente; le regioni a bassa endemia, con prevalenza di infezione inferiore al 2%, comprendono Europa Occidentale, Nord America e Australia⁹.

Attualmente l'Italia si attesta tra le regioni a basso livello endemico, con una prevalenza di infezione cronica intorno all'1%. Il nostro Paese ha assistito negli ultimi decenni ad un netto decremento delle infezioni, principalmente ottenuto grazie all'introduzione della vaccinazione obbligatoria per i nuovi nati a partire dal 1991¹⁰.

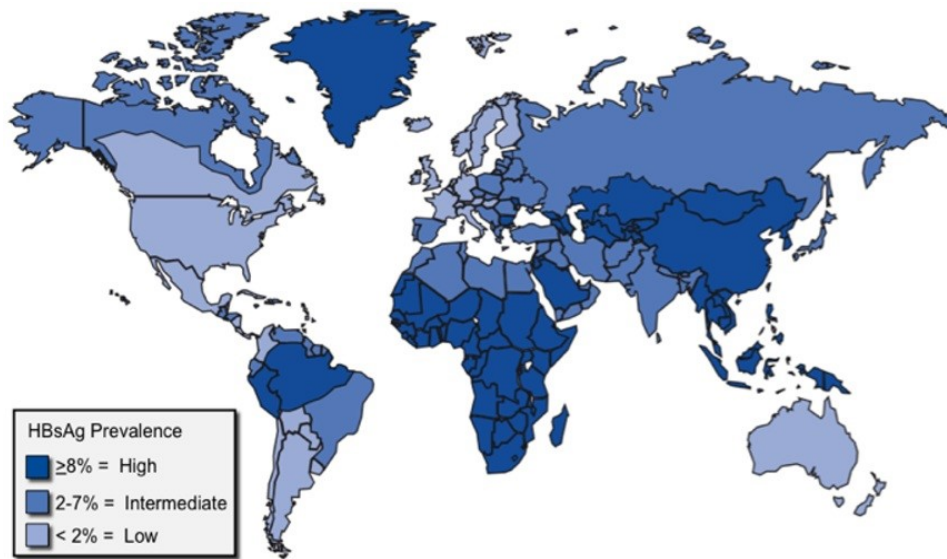


Figura 4. Mappa della prevalenza dell'infezione da HBV nel mondo.

I differenti colori evidenziano le aree geografiche ad alta, intermedia e bassa endemia.

Fonte: Hwang EW, MD, Cheung R, MD. Global Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) Infection.

North American Journal of Medicine and Science. 2011; 4(1): 7-13

2.2 Storia naturale dell'infezione

Il ciclo naturale dell'infezione cronica da HBV è un processo dinamico che si articola in fasi differenti derivate dall'interazione tra il virus, gli epatociti e la risposta immunitaria dell'ospite (**Figura 5**).

Vengono generalmente considerate cinque fasi, distinte in base a specifiche caratteristiche biochimiche, sierologiche e virologiche. È importante notare che queste fasi non si verificano in tutti i pazienti affetti da epatite cronica da HBV, inoltre non necessariamente si verificano in modo sequenziale¹¹.

- Fase 1: fase di infezione cronica HBeAg positiva, precedentemente denominata fase di immunotolleranza, è caratterizzata da una marcata replicazione virale, evidenziabile come HBV DNA nel siero presente ad alti livelli. Questi soggetti mostrano positività per HBeAg, livelli sierici di transaminasi (ALT) nella norma e profilo istologico epatico normale o lievemente alterato, riflettendo un'assente o minima risposta da parte del sistema immunitario verso gli epatociti infettati¹². La fase di immunotolleranza rappresenta la più frequente modalità di esordio delle infezioni contratte in età perinatale, dove questa fase può persistere da pochi anni a più di 30 anni, mentre è solitamente breve o assente nelle infezioni contratte in età adulta. Questi soggetti risultano altamente contagiosi, a causa dei livelli elevati di HBV DNA¹¹.
- Fase 2: fase di epatite cronica HBeAg positiva, rappresenta l'inizio della risposta immunitaria da parte dell'ospite per cercare di eradicare l'infezione. È una fase caratterizzata da livelli elevati di ALT nel siero, attività necroinfiammatoria a carico del tessuto epatico e alti livelli sierici di HBV DNA. Tale fase può verificarsi in pazienti che sono da vari anni in fase 1, è più frequente nelle infezioni contratte in età adulta e la sua durata è variabile. Nella maggior parte dei pazienti questa fase termina con la perdita di positività per HBeAg tramite sierconversione spontanea e sviluppo di anticorpi anti-HBe. In seguito a sierconversione l'80% circa dei soggetti entrerà nella fase di portatore inattivo, il 20% circa ritornerà ad uno stato HBeAg positivo, frequentemente accompagnato da riattivazione dell'epatite, e il 10-20% manterrà livelli elevati di ALT e HBV DNA, permanendo così in una fase di epatite cronica HBeAg negativa¹¹.

- Fase 3: fase di infezione cronica HBeAg negativa o fase di portatore inattivo, in quanto si assiste alla comparsa di anticorpi anti-HBe e perdita concomitante di HBeAg. In questa fase si osservano livelli di replicazione virale bassi o non rilevabili (HBV DNA < 2000 UI/ml) e normalizzazione dei livelli sierici di ALT. Il raggiungimento di questa fase, che può anche perdurare per tutta la vita del paziente, porta nell' 1-3% dei soggetti ogni anno alla clearance dell'HBsAg, sviluppo dei relativi anticorpi e l'ingresso in una fase di guarigione caratterizzata da basso rischio di cirrosi e di epatocarcinoma. Alcuni dei pazienti nella fase di portatore inattivo va incontro successivamente a riattivazione dell'infezione entrando così nella fase di epatite cronica HBeAg negativa¹¹.
- Fase 4: fase di epatite cronica HBeAg negativa, caratterizzata da periodiche riattivazioni virali, pertanto è associata a fluttuazioni dei livelli di HBV DNA e di ALT. Si osserva HBeAg negatività e anti-HBe positività. L'analisi istologica del fegato mostra necroinfiammazione e fibrosi.

La maggior parte dei pazienti con epatite cronica HBeAg negativa presenta varianti virali caratterizzate da mutazioni nelle regioni core e pre-core del genoma di HBV, che portano ad una riduzione o annullamento della sintesi dell'antigene HBeAg. La mutazione più comune è quella che si verifica nella regione pre-core, con switch da G ad A nel codone 1896, con conseguente comparsa di un codone di stop prematuro e abolizione della sintesi di HBeAg. Questa specifica variante virale (definita "e-minus") appare significativamente associata al genotipo D di HBV, genotipo maggiormente diffuso in Europa meridionale, dove il 30-80% dei pazienti sviluppa l'epatite cronica HBeAg negativa¹¹.

- Fase 5: fase di epatite cronica HBsAg negativa. Tale fase è caratterizzata dalla presenza di anticorpi anti-HBc, con o senza la presenza di anticorpi anti-HBs rilevabili nel siero. E' anche definita fase di "infezione occulta da HBV", caratterizzata da livelli sierici di ALT nella norma e HBV DNA solitamente (ma non sempre) non rilevabile. Nel fegato viene spesso rilevata la presenza di HBV DNA (cccDNA)¹¹.

Le variabili che sembrano influenzare maggiormente il decorso della malattia sono: l'età di acquisizione dell'infezione, il livello di replicazione virale e lo stato immunitario del soggetto. Come detto precedentemente, l'evoluzione dell'epatite B è influenzata anche dalla tipologia di genotipo virale. Ad esempio, i pazienti infettati da virus di genotipo C rimangono HBeAg positivi per un tempo maggiormente prolungato rispetto a soggetti infettati da virus appartenenti ad altri genotipi (A, B, D o F).

Inoltre, alti livelli di replicazione virale, il perdurare della malattia per molti anni, co-infezioni da HCV, HDV e HIV, l'abuso di alcool e infezione da parte di HBV di genotipo C rappresentano i principali fattori predittivi di un'evoluzione sfavorevole dell'infezione verso la cirrosi e l'epatocarcinoma (HCC). L'incidenza di epatocarcinoma è inoltre maggiore in presenza di cirrosi, in individui di sesso maschile e in età avanzata e nei soggetti con familiarità per l'HCC^{11,13}.

PHASE	1	2	3	4	5
New Terminology	HBeAg positive Chronic infection	HBeAg positive Chronic hepatitis	HBeAg negative Chronic infection	HBeAg negative Chronic hepatitis	Resolved HBV infection
Old terminology	Immune tolerant	HBeAg-positive CHB	Inactive carrier	HBeAg-negative CHB	HBsAg negative/anti-HBcore positive
HBsAg	High	High/Intermediate	Low	Intermediate	Negative
HBeAg	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative
HBV DNA	>10 ⁷ IU/mL	10 ⁴ -10 ⁷ IU/mL	<2,000 IU/mL	>2,000 IU/mL	<10 IU/ml
ALT	Normal	Elevated	Normal	Elevated	Normal
Liver disease	None/minimal	Moderate/severe	None	Moderate/severe	None
Disease progression	Low	Moderate to high	No, very low	Moderate to high	None
Treatment	Not indicated	Indicated	Not indicated	Indicated	Not indicated but prophylaxis for selected cases

Figura 5. Nuova classificazione delle fasi dell'infezione da HBV, secondo le recenti "EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection".

Fonte: Tabella gentilmente fornita dal Prof. P. Lampertico (presentazione orale, 2017)

3. Cenni di terapia antivirale

Le terapie attualmente approvate per il trattamento dell'epatite B cronica sono rivolte ad ottenere la soppressione a lungo termine della replicazione virale, in quanto quest'ultima rappresenta il parametro che maggiormente correla con la progressione della malattia verso la cirrosi, l'epatocarcinoma e l'insufficienza epatica. La completa eradicazione del virus è un risultato molto difficile da ottenere in quanto HBV presenta la tendenza ad integrarsi nel genoma dell'ospite o a restare latente come DNA circolare covalentemente chiuso all'interno del nucleo degli epatociti infettati. Le indicazioni al trattamento sono generalmente le stesse sia per i pazienti con epatite cronica da HBV HBeAg positiva sia per quelli con epatite cronica HBeAg negativa e si basano principalmente sul riscontro di livelli sierici di HBV DNA superiori a 2000 UI/ml, livelli di ALT oltre il limite di normalità e presenza di attività necroinfiammatoria e/o fibrosi riscontrate attraverso biopsia epatica¹⁴.

Attualmente si dispone di due categorie di farmaci approvati da "U.S. Food and Drug Administration" (FDA) per il trattamento dell'epatite cronica da HBV:

- Interferoni: Interferone standard (IFN- α) e Interferone peghilato (pegIFN- α);
- Analoghi nucleosidici e nucleotidici, a cui ci si riferisce con l'acronimo "NUC":
Lamivudina (LAM), Telbivudina (LdT), Entecavir (ETV), Adefovir (ADV) e Tenofovir (TDF).

Tra questi, gli analoghi nucleos(t)idici (NUC) si sono dimostrati maggiormente efficaci nell'indurre la soppressione dei livelli sierici di HBV DNA, sia nei pazienti con epatite cronica HBeAg positiva che in quelli con epatite cronica HBeAg negativa¹⁴.

3.1 Interferoni

Gli Interferoni sono una famiglia di citochine glicoproteiche e presentano un'azione antivirale, antiproliferativa e immunomodulante. L'IFN- α è stato il primo farmaco disponibile per il trattamento dell'epatite cronica da HBV, ma attualmente è stato soppiantato dall'Interferone peghilato (pegIFN- α), costituito da IFN- α addizionato di una molecola di polietilene glicole, approvato nel 2005. L'obiettivo di questo trattamento è quello di portare l'epatite cronica attiva ad una forma inattiva (fase di portatore inattivo) attraverso la soppressione della replicazione virale. L'Interferone peghilato viene somministrato attraverso iniezione sottocutanea a cadenza settimanale per dodici mesi; tale trattamento presenta pertanto una durata limitata nel tempo, è caratterizzato da una bassa frequenza di sviluppo di resistenza farmacologica e risulta efficace anche nell'induzione della sierconversione nei pazienti con epatite cronica HBeAg positiva (30% ogni anno).¹⁵ Per contro, la frequenza degli effetti collaterali sviluppati dal farmaco è alta e vi è controindicazione assoluta in caso di cirrosi scompensata, riacutizzazione dell'epatite e in gravidanza e allattamento. Il trattamento con pegIFN- α risulta efficace in una percentuale limitata di pazienti: solo il 5% dei soggetti trattati ottiene la negativizzazione dell'HBsAg dopo 6 mesi di trattamento e il 10% dopo 3 anni.

3.2 Analoghi nucleos(t)idici

Gli analoghi nucleosidici e nucleotidici (NUC) sono stati introdotti in terapia in tempi più recenti; competono con il substrato naturale della polimerasi virale, deossadenosina trifosfato (dATP), inibendo così l'attività di trascrittasi inversa e la replicazione virale¹⁶.

I NUC sono indicati nelle forme di infezione cronica HBeAg negativa e come trattamento di secondo livello nei pazienti che non mostrano una risposta virologica sostenuta ad un

tentativo terapeutico con Interferone. Inoltre, questa strategia farmacologica è raccomandata in tutti i pazienti con cirrosi, indipendentemente dallo stato di HBeAg, in quanto l'utilizzo del PEG-IFN-alpha potrebbe aumentare il rischio di scompenso epatico. Questo approccio terapeutico presenta alcuni vantaggi rispetto al trattamento con Interferone, come una migliore maneggevolezza grazie alla somministrazione orale, la scarsa induzione di effetti collaterali, una maggiore compliance da parte dei pazienti, sebbene la sicurezza a lungo termine di queste molecole necessiti di ulteriori studi di approfondimento.¹¹ Tra gli svantaggi dei NUC va considerato il rischio di sviluppare resistenze farmacologiche, che possono diminuire la sensibilità del virus al farmaco stesso. Gli analoghi nucleos(t)idici di prima generazione come la lamivudina trovano ormai scarsa indicazione in monoterapia, in quanto dotati di bassa barriera genetica (numero di mutazioni necessarie a produrre una marcata riduzione della suscettibilità al farmaco), che porta ad uno sviluppo di resistenze fino al 70% a 5 anni¹⁷.

Gli analoghi di terza generazione (entecavir e tenofovir disoproxil fumarato) sono invece farmaci dall'elevata barriera genetica e allo stesso tempo dall'elevata potenza (relazione tra concentrazione plasmatica raggiunta e intensità dell'effetto farmacologico) e presentano pertanto un'efficacia significativamente maggiore rispetto alle molecole di prima generazione sui parametri virologici, biochimici ed istologici. Per questa ragione sono considerati farmaci di prima scelta da utilizzare in monoterapia. Pur essendo efficaci nell'indurre un controllo completo della replicazione virale in oltre il 90% dei pazienti nella pratica clinica corrente, gli analoghi nucleos(t)idici determinano un calo molto lento dei livelli sierici di HBsAg, cosicchè la loro somministrazione non può essere sospesa se non dopo la presenza di sieroconversione anti-HBs, indicativa di un completo controllo immunitario nei confronti del virus evitando il rischio di una riattivazione virale. Poichè tale evento è sempre

tardivo in corso di terapia e ristretto ad una percentuale limitata di pazienti, e dato che le riattivazioni dell'epatite possono essere estremamente severe, soprattutto se la funzionalità epatica è già di base compromessa, la terapia con analoghi è destinata ad essere mantenuta per un tempo indeterminato nella quasi totalità dei pazienti.^{11,18} Data l'efficacia antivirale degli analoghi di ultima generazione, la loro eccellente tollerabilità e la loro elevata barriera genetica, le terapie del prossimo futuro dovranno certamente comprendere tali farmaci come "back bone", ai quali associare nuove molecole, che permettano di accorciarne la somministrazione, favorendo la clearance di HBsAg e inducendo possibilmente l'eradicazione del virus.

3.3 Nuove strategie terapeutiche

L'obiettivo che si vuole raggiungere è lo sviluppo di una terapia basata su tempi di somministrazione limitati, con un basso rischio associato allo sviluppo di resistenze farmacologiche e alla comparsa di effetti collaterali, capace di portare alla clearance dell'HBsAg in modo stabile e duraturo nel tempo e, possibilmente, alla eradicazione completa del virus. Alcuni studi attualmente in corso cercano di individuare composti capaci di intervenire su vari aspetti del ciclo vitale di HBV e, a tale proposito, i potenziali targets terapeutici potrebbero includere: l'inibizione dell'ingresso del virus nella cellula epatica, la distruzione del nucleocapside virale, l'intervento diretto sul cccDNA e la prevenzione della liberazione dell'HBsAg. Altre strategie terapeutiche in studio riguardano l'intervento sul sistema immunitario dell'ospite, con l'obiettivo di stimolare la risposta immunitaria contro il virus e rendere più efficace il trattamento antivirale¹⁹. **(Figura 6)**

Con l'obiettivo di stimolare la risposta immunitaria innata si stanno sperimentando analoghi dei toll-like receptors. I recettori Toll-like (TLR) sono recettori che svolgono un ruolo chiave

nel riconoscimento di agenti patogeni esterni, sia batteri che virus, come parte della risposta immunitaria innata. TLR3, 7/8 e TLR9 sono una sottofamiglia TLR che riconoscono acidi nucleici virali endosomiali (dsRNA, ssRNA e motivi CpG rispettivamente) e inducono la produzione di IFN di tipo 1²⁰.

Con l'obiettivo di stimolare la risposta immunitaria CD4+ e CD8+ specifica si stanno sperimentando possibili vaccini terapeutici. Lo scopo dei vaccini terapeutici è quello di ripristinare o indurre una risposta da parte delle cellule T migliorando la qualità della presentazione dell'antigene da parte delle cellule specializzate, in un contesto in cui vi è:

- una consistente produzione di antigeni ritenuti responsabili dell'*exhaustion* delle cellule T sistemiche e locali.

- una presentazione inadeguata degli antigeni da parte degli epatociti in cui avviene la replicazione dell'HBV^{19,21,22}.

Le ricerche in corso devono pertanto considerare i farmaci attualmente disponibili e sperimentare inoltre nuovi composti, da utilizzare principalmente in terapie combinate, con l'obiettivo di identificare la sinergia necessaria ed efficace per il trattamento dell'epatite cronica da HBV.

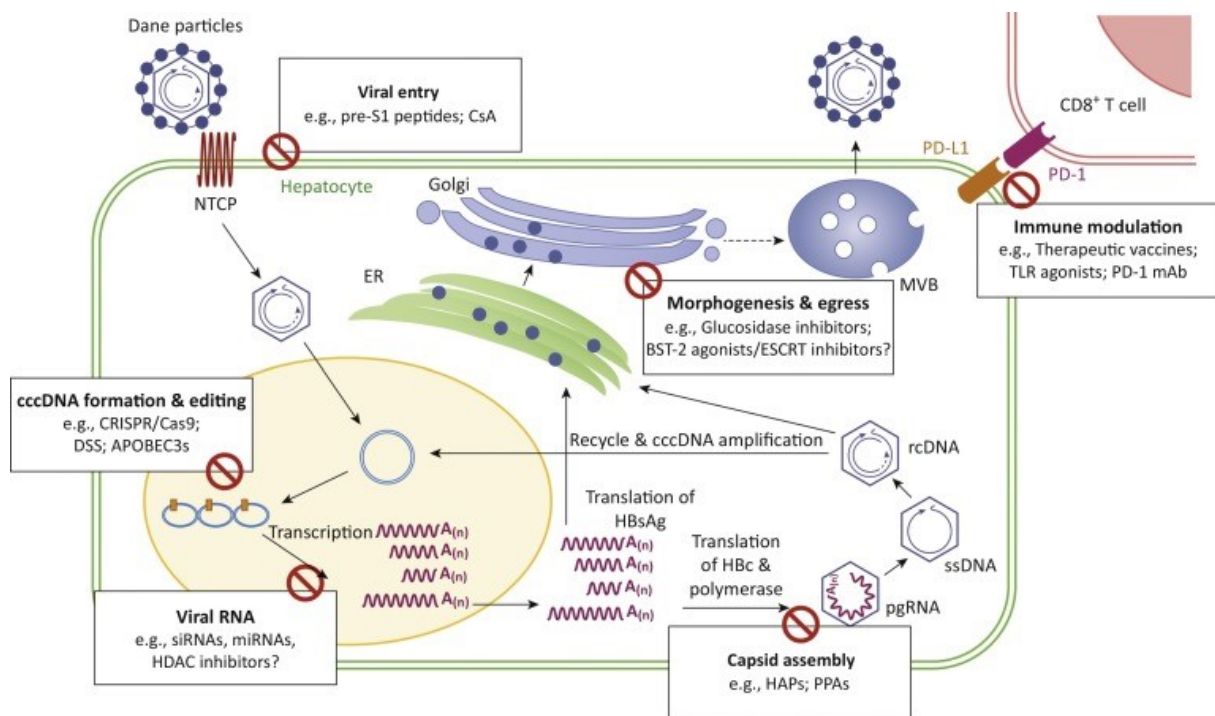


Figura 6. Rappresentazione grafica dei potenziali bersagli terapeutici all'interno del ciclo vitale di HBV.
 Fonte: Shih C, Chou SF, Yang CC, Huang JY, Chojjilsuren G, Jhou RS. Control and eradication strategies of hepatitis B virus. *Trends Microbiol.* 2016; 24(9): 739–749

4. Immunopatogenesi dell'infezione da virus dell'epatite B

I danni riscontrati a livello epatico durante l'infezione da HBV sono prevalentemente determinati dalla risposta immunitaria dell'organismo ospite, la quale spesso provoca la distruzione delle cellule infettate. Il virus stesso non sembra manifestare un effetto citopatico diretto, come è stato confermato da studi eseguiti utilizzando il modello murino di HBV²³. La relazione tra il virus e l'organismo ospite si presenta come un processo dinamico all'interno del quale il virus tenta di diminuire la sua visibilità e l'ospite cerca di prevenire ed eradicare l'infezione. Questa interazione tra il virus e il sistema immunitario dell'ospite è responsabile della clearance virale o della progressione dell'infezione; in particolare la risposta acquisita cellulo-mediata sembra giocare un ruolo chiave nel determinare la risoluzione o, al contrario, la cronicizzazione dell'infezione.²³ Il ruolo della risposta immunitaria innata durante l'infezione da virus dell'epatite B è tuttora oggetto di dibattito. La conoscenza dei meccanismi immunitari innati anti-HBV è ostacolata da limitazioni di tipo tecnico, come la difficoltà di reclutare pazienti nella fase pre-sintomatica dell'infezione acuta e la scarsità di modelli animali e linee cellulari adatti all'infezione e alla replicazione di HBV²⁴. Studi eseguiti *in vivo* nei modelli animali di scimpanzé e marmotta hanno indicato una debole attivazione della risposta immunitaria intracellulare durante la fase precoce dell'infezione da virus dell'epatite B, il quale sembra essere debolmente percepito dall'immunità innata. Altri studi hanno dimostrato, al contrario, l'attivazione dell'espressione intraepatica di geni coinvolti nella risposta immunitaria innata subito dopo l'infezione in marmotte; tale risposta risulta essere tuttavia transitoria e stimolata in presenza di inoculi ad elevata concentrazione virale²⁵.

Uno dei primi eventi attraverso cui la risposta immunitaria innata dell'ospite contrasta il virus consiste nel rilascio di Interferoni di tipo I (IFN- α e IFN- β) da parte degli epatociti

infettati. Questi Interferoni presentano una funzione antivirale diretta attraverso la destabilizzazione dei capsidi virali, l'inibizione della sintesi di nuovi capsidi e la degradazione dell'HBV RNA preformato. IFN- α e IFN- β promuovono inoltre il reclutamento e l'attivazione di cellule presentanti l'antigene come le cellule Kupffer (macrofagi residenti nel fegato) e le cellule dendritiche. Queste cellule, dopo essere state attivate, reclutano cellule NK e macrofagi, che giocano un ruolo importante nella risposta immunitaria iniziale contro il virus²⁶.

Molte sono le strategie utilizzate da HBV per cercare di evadere questa prima linea di difesa attuata dall'organismo ospite: l'uso di un DNA templato per la trascrizione (cccDNA) sequestrato nel nucleo delle cellule infettate, la sintesi di un mRNA virale poliadenilato che mima i trascritti cellulari, la protezione dei genomi neosintetizzati all'interno di capsidi virali nel citoplasma. Oltre a ciò, HBV sembra in grado di bloccare l'attività antivirale degli Interferoni di tipo I e di inibire sia l'espressione stessa dei recettori TLR che la risposta mediata da questi recettori^{24,25}. Anche la risposta immunitaria umorale interviene nel controllo dell'infezione, attraverso la sintesi di anticorpi specifici contro gli antigeni virali. Gli anticorpi HBV-specifici sono importanti sia come meccanismi di protezione sia come marcatori utili per il riconoscimento delle diverse fasi dell'infezione. Le IgM HBcAg-specifiche rappresentano un marcatore precoce d'infezione, al contrario anticorpi specifici contro HBeAg e HBsAg appaiono più tardivamente e costituiscono degli indicatori di progressione favorevole dell'infezione. Anticorpi anti-HBs possono persistere per tutta la vita nei soggetti che guariscono dall'epatite e garantiscono un'immunità protettiva nei confronti di eventuali reinfezioni²⁷. La produzione di anticorpi è un elemento critico per la neutralizzazione di particelle virali solubili; tuttavia, si ritiene che l'evoluzione dell'infezione acuta verso la risoluzione oppure verso la cronicizzazione dipenda dall'efficienza della risposta immunitaria

acquisita cellulo-mediata. Questo tipo di risposta si basa sull'attività delle due popolazioni di linfociti T, CD4+ e CD8+, e inizia dopo circa 1-2 settimane dall'esordio della replicazione virale di HBV all'interno degli epatociti infettati (**Figura 7**).

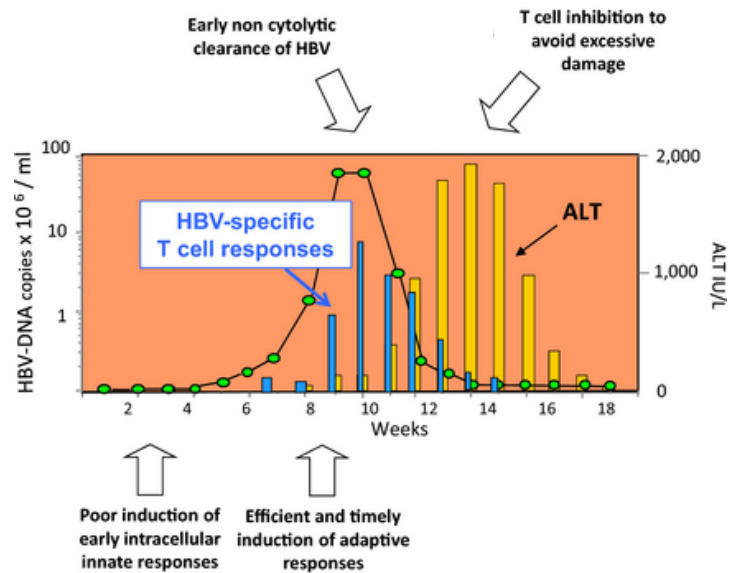


Figura 7. Cinetica della sequenza di eventi immunologici che avvengono durante un'infezione acuta autolimitata da HBV, contratta in età adulta.

Nonostante la debole induzione da parte di HBV della risposta immunitaria innata, la risposta T linfocitaria HBV-specifica si attiva in modo efficiente e tempestivo subito dopo l'esordio della replicazione virale, la quale ha generalmente inizio dopo alcune settimane dal momento in cui l'infezione è stata contratta.

Modificata da: Ferrari C. HBV and the immune response. *Liver International*. 2014; 35: 121–128

Studi eseguiti sul modello murino e in scimpanzé hanno dimostrato che la popolazione linfocitaria CD4+ non svolge un ruolo centrale come effettrice ma risulta fondamentale per l'attivazione e, soprattutto, per il mantenimento dei linfociti T CD8+ e dei linfociti B virus-specifici²⁸. I linfociti T CD4+ rappresentano anche i maggiori produttori di IL-2 e IL-21, citochine che influenzano il differenziamento dei linfociti T CD8.

I linfociti T CD8+ giocano un ruolo chiave durante la risoluzione dell'infezione da HBV, infatti, la deplezione di queste cellule nel modello animale dimostra l'impossibilità di andare incontro alla clearance virale. I linfociti T CD8+, come detto precedentemente, possono intervenire sia attraverso un meccanismo citotossico, che promuove la lisi diretta degli epatociti infettati, sia attraverso un meccanismo non citotossico, basato sul rilascio di citochine, soprattutto IFN- γ e TNF- α (**Figura 8**)^{28,29}. Queste ultime agiscono da mediatori per il reclutamento di altre cellule effettrici, come macrofagi e neutrofili; TNF- α e IFN- γ possono, inoltre, inibire l'espressione genica virale all'interno degli epatociti infettati senza determinare la lisi cellulare, in questo modo viene contrastato il virus nella sua localizzazione intracellulare limitando il danno a livello epatico³⁰.

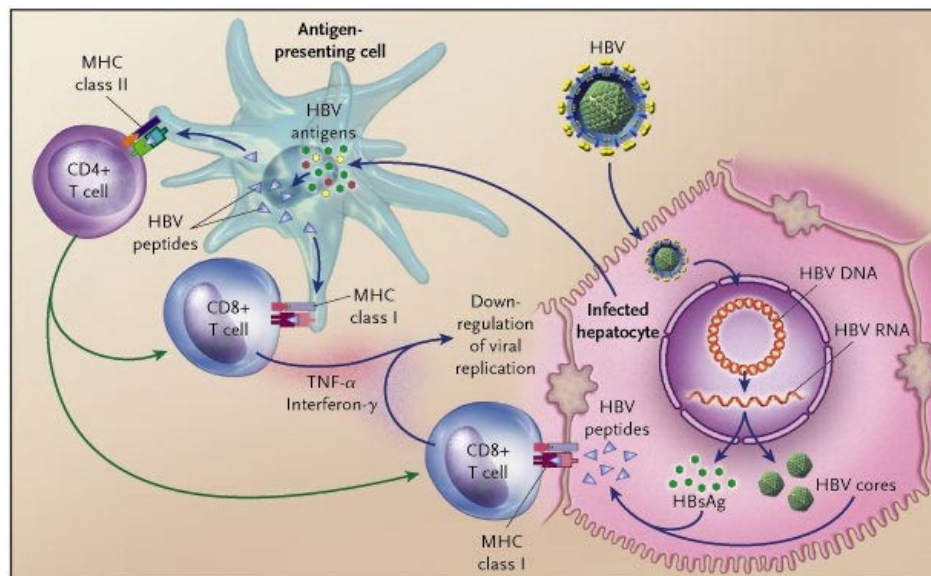


Figura 8. Risposta immunitaria cellulo-mediata contro HBV.

Fonte: Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-Natural history and clinical consequence. *New England Journal of Medicine*. 2004; 350: 1118-1129.

I pazienti che tendono a guarire spontaneamente in seguito ad infezione acuta da HBV presentano tipicamente una risposta T CD4+ e CD8+ tempestiva, vigorosa e multispecifica, ossia capace di riconoscere molteplici epitopi antigenici del virus; ciò garantisce un'efficiente riconoscimento degli epatociti infettati e diminuisce la probabilità che HBV possa evadere il controllo linfocitario.³¹ Tuttavia, la risoluzione dell'infezione non implica la completa eradicazione del virus, piuttosto riflette la capacità del sistema immunitario, in particolare dei linfociti CD4+ e CD8+, di apportare un controllo persistente e stringente sulla replicazione di HBV. Alcuni linfociti T HBV-specifici permangono in uno stato attivato per molti anni in seguito alla risoluzione dell'epatite acuta: queste risposte sembrano essere mantenute a causa di una stimolazione continua da parte di piccole quantità di virus che permangono nell'organismo ospite, rivelabili unicamente attraverso PCR. Questa condizione di persistenza del genoma del virus associata ad una forte soppressione della replicazione ed espressione genica virale è definita "infezione da HBV occulta".

Nei pazienti che vanno incontro a cronicizzazione dell'infezione si osservano risposte T linfocitarie tardive, meno intense e transitorie. In questo caso il sistema immunitario non sembra in grado di attivare una risposta antivirale rapida ed efficiente, pertanto il virus ha la possibilità di mettere in atto meccanismi per eludere il controllo immunitario favorendo la persistenza dell'infezione^{32,33}.

5. Esaurimento funzionale dei linfociti T nell'infezione cronica da HBV

I pazienti con epatite cronica sono caratterizzati da elevati livelli di replicazione virale e da un progressivo declino dell'immunità acquisita associata a bassi livelli di linfociti T HBV-specifici riscontrati nel sangue periferico e nell'ambiente intraepatico e ad una ridotta produzione di anticorpi virus-specifici. La persistenza di HBV è generalmente accompagnata da un'alterata maturazione e differenziazione dei linfociti T e a deboli risposte T linfocitarie CD4+ e CD8+ virus-specifiche. L'esposizione prolungata di queste cellule ad alte dosi di antigeni virali (HBeAg e HBsAg) sembra essere una delle cause principali della perdita progressiva di funzionalità dei linfociti T virus-specifici durante l'infezione cronica da HBV, processo noto come "*exhaustion*"^{34,35}. Questo fenomeno si sviluppa nel corso di infezioni croniche causate da vari tipi di virus, come HBV, HCV, HIV e nel caso di neoplasie; è stato identificato per la prima volta studiando le risposte T linfocitarie CD8+ virus-specifiche durante l'infezione cronica da virus della Coriomeningite Linfocitaria (LCMV) nel modello murino³⁶.

I linfociti T CD8+ "*exhausted*" risultano in generale disfunzionali: caratterizzati dalla perdita dell'attività citotossica, compromissione della produzione e secrezione di citochine e incapacità di espansione clonale in seguito al contatto con l'antigene.³⁵ Queste cellule presentano un'espressione prolungata e ad alti livelli di recettori capaci di attivare vie di segnalazione inibitorie, come PD1, TIM3, CTLA4 e 2B4^{25,35,37}. Nel caso specifico del recettore co-inibitorio PD1, questo sembra svolgere un ruolo cruciale nel fenomeno dell'*exhaustion*, risultando costantemente espresso non solo nei linfociti virus-specifici circolanti di pazienti con epatite cronica, ma anche nei linfociti T HBV-specifici intraepatici, nei quali presenta livelli di espressione maggiori, testimoniando l'esistenza di un profondo stato di *exhaustion* intraepatica²⁵. L'importanza dell'inibizione apportata da questi recettori è data dal fatto che si possa ottenere il recupero parziale delle funzionalità antivirali dei linfociti T attraverso il

blocco *in vitro* dei *pathways* attivati dai recettori co-inibitori, ad esempio prevenendo l'interazione tra il recettore PD1 e il suo ligando PD-L1^{37,38}. Oltre alle molecole inibitorie, anche alcune citochine ad azione soppressiva sembrano influenzare il fenomeno dell'*exhaustion*, come TGF- β e IL-10, la cui espressione aumenta in caso di persistenza virale contribuendo alla disfunzione T linfocitaria³⁵. I linfociti T "*exhausted*" mostrano un assetto trascrizionale differente rispetto a quello delle cellule T effettrici o di memoria che mantengono la loro funzionalità antivirale, come è stato ampiamente dimostrato attraverso studi condotti su modelli animali: in particolare i fattori di trascrizione Blimp-1 e T-bet svolgono un ruolo centrale nell'*exhaustion* dei linfociti T CD8+. L'espressione di Blimp-1 aumenta durante l'infezione cronica e ciò provoca up-regolazione di molti recettori inibitori. T-bet, al contrario, inibisce l'espressione dei recettori inibitori e promuove il differenziamento cellulare; la persistente stimolazione da parte degli antigeni virali provoca la down-regolazione di T-bet^{35,39}.

Il fenomeno dell'*exhaustion* si realizza in modo gerarchico, attraverso diversi gradi di esaurimento funzionale che accompagnano la progressiva perdita di funzionalità dei linfociti T all'aumentare della carica antigenica virale a cui queste cellule sono esposte (**Figura 9**)³⁵.

Durante la prima fase dell'infezione cronica, o in presenza di una carica antigenica virale non eccessiva, i linfociti T assumono le caratteristiche di cellule "parzialmente *exhausted*": esse perdono la capacità di produrre IL2, la sintesi di TNF- α inizia ad essere compromessa, diminuisce sia la funzionalità citotossica *ex vivo* che la loro capacità proliferativa. Durante la fase successiva, le cellule diventano incapaci di produrre TNF- α e si riduce la capacità di sintesi di IFN- γ . La fase di "*exhaustion* completa" prevede la perdita di tutte le funzioni effettrici dei linfociti T CD8+ e si verifica quando la carica antigenica virale raggiunge livelli molto elevati e/o quando l'attività dei linfociti T CD4+ è compromessa. La fase finale del

processo di *exhaustion*, nota come “deletion”, prevede l’eliminazione fisica mediante apoptosi della cellula T virus-specifica³⁵.

La prevenzione e la reversione dell’*exhaustion* dei linfociti T virus-specifici rappresentano delle strategie teoricamente perseguibili nel tentativo di implementare la risposta immunitaria dell’ospite e favorire così il controllo virale durante le infezioni croniche³⁵.

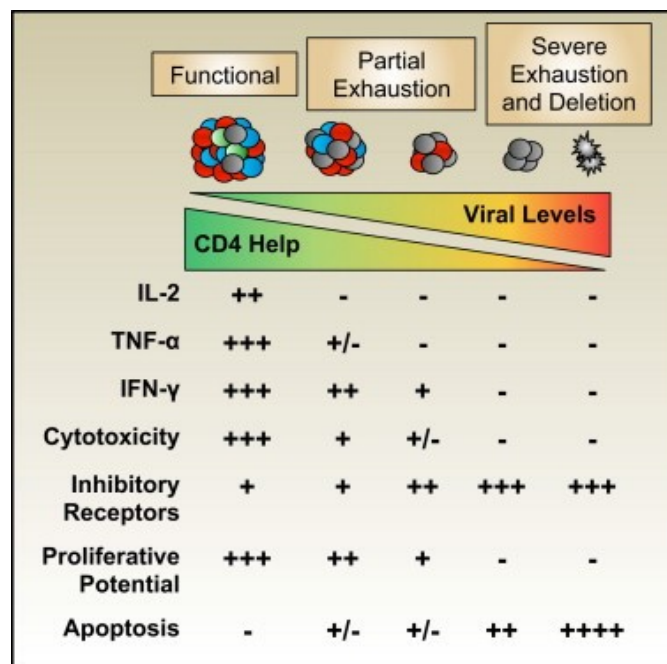


Figura 9. Progressivo esaurimento funzionale dei linfociti T CD8+ durante un’infezione virale cronica.

Fonte: Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ, T cell *exhaustion* during persistent viral infections.

Virology. 2015; 479-480: 180-193

6. Dati preliminari

La conoscenza sempre più avanzata dei meccanismi cellulari e molecolari che regolano il processo dell'*exhaustion* ha permesso di identificare molteplici *pathways* che possono essere utilizzati come target per cercare di prevenire, o recuperare, la perdita di responsabilità dei linfociti T durante l'infezione cronica³⁵. Molti studi si sono focalizzati sul tentativo di bloccare *in vitro* le vie di segnalazione attivate dai recettori co-inibitori, identificati in modelli sperimentali animali di infezione cronica⁴⁰. Tuttavia, in corso di epatite B cronica, tali strategie risultano efficaci solo in una frazione di pazienti e, nei casi in cui si osserva il recupero funzionale dei linfociti T, questo è sempre parziale^{38,41-45}.

6.1 Analisi dei profili trascrizionali dei linfociti T HBV-specifici funzionalmente esauriti

Allo scopo di identificare nuovi targets molecolari per il ripristino dell'attività antivirale linfocitaria, è stata realizzata un'analisi dei profili trascrizionali globali dei linfociti T CD8 HBV-specifici "*exhausted*" isolati da pazienti cronici, confrontati con i profili di espressione genica ottenuti dai linfociti che mantengono la loro funzionalità antivirale, ossia cellule HBV-specifiche di soggetti nella fase di convalescenza di un'infezione acuta capace di risolversi spontaneamente (guariti), ma anche linfociti influenza-specifici (FLU) di individui sani⁴⁶.

L'analisi del confronto tra pazienti cronici e guariti o soggetti sani (Gene Set Enrichment Analysis – GSEA) ha evidenziato una marcata tendenza alla down-regolazione di diverse funzioni cellulari nei linfociti T "*exhausted*", tra cui particolarmente significativi sono risultati i *pathways* mitocondriali, del proteasoma, i processi di risposta al danno del DNA e di regolazione della trascrizione genica (**Figura 10**)⁴⁶. Più nel dettaglio, i geni down-regolati relativi ai processi mitocondriali sono quelli coinvolti nella catena di trasporto degli elettroni, come subunità del complesso I (NADH deidrogenasi), II (succinato deidrogenasi), III

(citocromo c reduttasi), IV (citocromo c ossidasi) e V (ATP sintasi), geni coinvolti nella regolazione della trascrizione del genoma mitocondriale e successiva sintesi proteica, nel trasporto attraverso la membrana del mitocondrio, nel metabolismo cellulare (in particolare il metabolismo degli acidi grassi e degli aminoacidi, la biosintesi dell'eme e di altri cofattori contenenti Fe²⁺) e nel sistema di "controllo della qualità" del mitocondrio. Poiché il mitocondrio, non solo rappresenta il principale organello che regola i processi metabolici ed energetici della cellula, ma gioca anche un ruolo di fondamentale importanza nell'attivazione e nel differenziamento T linfocitario, i meccanismi mitocondriali risultano essenziali nella regolazione della risposta immunitaria, sia innata che adattativa⁴⁷.

Considerando il proteasoma, tra le molteplici funzioni svolte, oltre a catalizzare la degradazione delle proteine precedentemente ubiquitinate e a processare i peptidi antigenici per la successiva "presentazione" da parte delle cellule APC (immuno-proteasoma), esso influenza la produzione di citochine, il differenziamento, la sopravvivenza e la funzione dei linfociti T^{48,49}. I geni relativi al proteasoma risultati ampiamente down-regolati sono quelli codificanti per le subunità del proteasoma 26S: la subunità 20S con attività proteolitica e le subunità 19S e 11S con funzione regolatoria.

Tra i molteplici geni codificanti per fattori coinvolti nella risposta al danno al DNA sono risultati significativamente down-regolati quelli codificanti per proteine p53-dipendenti, come la chinasi ATM, la cui alterazione è stata associata al processo dell'immunosenescenza⁵⁰, proteine p53-indipendenti coinvolte nella riparazione del danno al DNA (RAD 17, 21, 23A, 23B) e la DNA polimerasi POLH, con azione specifica nella riparazione del DNA. Inoltre, anche geni codificanti per subunità della RNA polimerasi, fattori trascrizionali e proteine di regolazione della cromatina sono risultati down-regolati nei pazienti con infezione cronica.

Globalmente, questi dati sottolineano una profonda inibizione dei linfociti T virus-specifici funzionalmente esauriti di pazienti con epatite cronica B, come indicato dalla estesa down-regolazione di numerosi processi biologici associata all'aumentata espressione di geni ad attività regolatoria negativa. Tale conclusione è ulteriormente confermata dal confronto dei profili trascrizionali dei linfociti HBV-specifici dei pazienti cronici con quelli ottenuti da linfociti influenza (FLU)-specifici di soggetti sani⁴⁶.

NAME	NES	NOM p-val	FDR q-val
REACTOME_RESPIRATORY ELECTRON TRANSPORT ATP SYNTHESIS BY CHEMIOSMOTIC COUPLING AND HEAT PRODUCTION BY UNCOUPLING PROTEINS	-2.006	< 10 ⁻⁴	0.0094
REACTOME_RESPIRATORY ELECTRON TRANSPORT	-1.855	< 10 ⁻⁴	0.0343
KEGG_OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	-1.693	0.0022	0.0958
KEGG_PROTEASOME	-2.059	< 10 ⁻⁴	0.0061
REACTOME_P53 DEPENDENT G1 DNA DAMAGE RESPONSE	-1.988	< 10 ⁻⁴	0.0096
REACTOME_P53 INDEPENDENT G1 S DNA DAMAGE CHECKPOINT	-1.922	< 10 ⁻⁴	0.022
REACTOME_RNA POL I PROMOTER OPENING	-2.414	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴
REACTOME_RNA POL I RNA POL III AND MITOCHONDRIAL TRANSCRIPTION	-2.153	< 10 ⁻⁴	0.0025
REACTOME_RNA POL I TRANSCRIPTION	-2.074	< 10 ⁻⁴	0.0048
REACTOME_TRANSCRIPTION	-1.966	< 10 ⁻⁴	0.0123
REACTOME_DEPOSITION OF NEW CENPA CONTAINING NUCLEOSOMES AT THE CENTROMERE	-1.922	< 10 ⁻⁴	0.0099
REACTOME_PACKAGING OF TELOMERE ENDS	-1.996	< 10 ⁻⁴	0.0104
REACTOME_ER PHAGOSOME PATHWAY	-2.036	< 10 ⁻⁴	0.007
REACTOME_REGULATION OF ORNITHINE DECARBOXYLASE	-1.777	< 10 ⁻⁴	0.058
KEGG_SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS	-1.78	< 10 ⁻⁴	0.058
REACTOME_SIGNALING BY THE B CELL RECEPTOR BCR	-1.73	0.0022	0.082
REACTOME_ENOS ACTIVATION AND REGULATION	-1.708	0.0195	0.0864

Figura 10. Set di geni risultati maggiormente significativi nel confronto dell'espressione genica dei linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti cronici e soggetti guariti.

Tali risultati sono stati identificati applicando la Gene-Set Enrichment Analysis ai profili di espressione genica. I riquadri rossi mettono in evidenza i processi mitocondriali, del proteasoma, i *pathways* coinvolti nella risposta al danno al DNA e nella regolazione della trascrizione genica.

Fonte: Fiscaro P., Barili V., Montanini B., Acerbi G., Ferracin M., Guerrieri F., Salerno D., Boni C., Massari M., Cavallo M.C. Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of *exhausted* HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. *Nat. Med.* 2017;23:327–336

6.2 Validazione della disfunzione mitocondriale e del proteasoma nei linfociti HBV-specifici di pazienti con epatite cronica B.

Le alterazioni relative ai *pathways* mitocondriali e del proteasoma, individuate attraverso l'analisi dei profili trascrizionali dei linfociti T HBV-specifici di pazienti con infezione cronica, sono state validate sia dal punto di vista molecolare che funzionale, con l'obiettivo di confermare un'effettiva disfunzione di tali meccanismi nei linfociti "exhausted".

Sono stati quindi selezionati 27 geni da testare con tecnologia NanoString, dei quali 23 appartenenti a processi mitocondriali e 4 del proteasoma. Il 74% dei geni analizzati si sono confermati down-regolati nella popolazione di linfociti T CD8 HBV-specifici di pazienti cronici rispetto ai soggetti guariti (rapporto cronici vs risolti < 0.8), validando così la down-regolazione osservata negli esperimenti di microarrays (**Figura 11**)⁴⁶.

Mediante l'utilizzo di specifiche sonde fluorescenti rilevabili tramite citometria a flusso, sono state validate anche dal punto di vista funzionale le alterazioni mitocondriali e del proteasoma identificate mediante l'analisi dei profili trascrizionali nei linfociti T "exhausted"⁴⁶. In **Figura 12** è possibile notare che nei pazienti con infezione cronica è stata rilevata una maggiore quantità di linfociti T virus-specifici con membrana mitocondriale depolarizzata, rispetto ai soggetti guariti e ai controlli sani. Inoltre, i linfociti T "exhausted" presentano un maggiore livello di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nell'ambiente mitocondriale, rispetto ai controlli, indicando quindi la presenza di stress ossidativo (**Figura 13**)⁴⁶. Questi dati hanno confermato la presenza di una profonda alterazione della funzionalità mitocondriale nei linfociti T HBV-specifici in corso di infezione cronica.

Utilizzando una sonda fluorescente capace di rilevare la presenza di aggregati proteici intracellulari, è stata inoltre validata la disfunzione del sistema ubiquitina-proteasoma nei linfociti HBV-specifici di pazienti con infezione cronica. Come è possibile notare in **Figura 14**,

nei pazienti cronici si ha un maggiore accumulo di aggregati proteici rispetto ai controlli sani ed ai pazienti guariti.

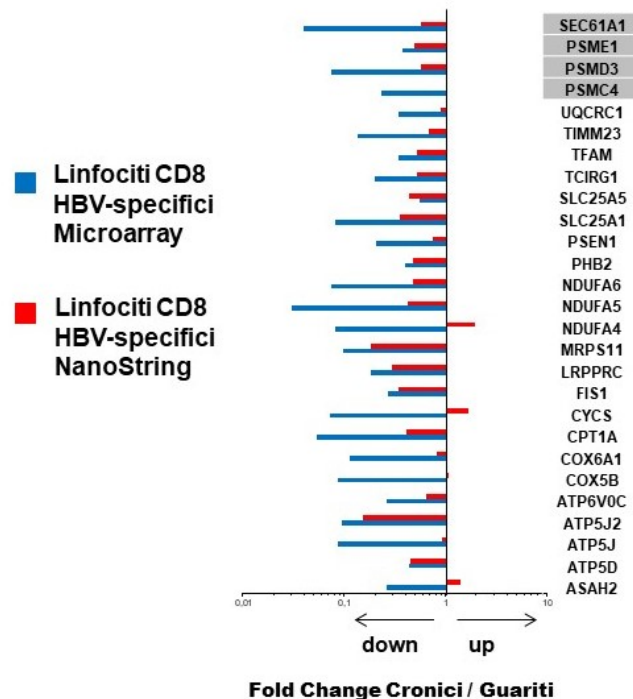


Figura 11. Validazione dei livelli di espressione di geni coinvolti in processi mitocondriali e del proteasoma utilizzando la tecnologia NanoString.

I grafici a barre rappresentano i 27 geni, differenzialmente espressi tra pazienti cronici e soggetti guariti, risultati più significativi in seguito ad analisi dei dati di espressione genica precedentemente ottenuti da microarrays. Tali geni sono relativi a *pathways* mitocondriali (23 geni) e del proteasoma (4 geni, nel riquadro grigio in alto). Per ogni gene è stato illustrato il rapporto (fold change) tra i valori medi ottenuti nei pazienti cronici e nei soggetti guariti, dall'analisi di microarrays (in blu, linfociti T CD8 HBV-specifici) e utilizzando la tecnologia Nanostring (in rosso, linfociti T CD8 HBV-specifici).

Modificata da: Fiscaro P., Barili V., Montanini B., Acerbi G., Ferracin M., Guerrieri F., Salerno D., Boni C., Massari M., Cavallo M.C. Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of *exhausted* HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. *Nat. Med.* 2017;23:327–336

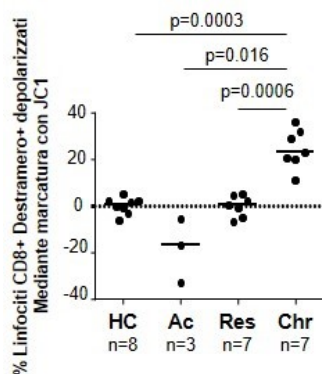


Figura 12. Determinazione della percentuale di linfociti depolarizzati CD8+ Influenza-specifici per i controlli sani (HC) e CD8+ HBV-specifici per i pazienti acuti (Ac), guariti (Res) e cronici (Chr), dopo stimolazione con anticorpo anti-CD3.

Sono riportati i risultati ottenuti in seguito a marcatura dei linfociti T CD8 virus-specifici con la sonda JC-1.

Modificata da: Fisticaro P., Barili V., Montanini B., Acerbi G., Ferracin M., Guerrieri F., Salerno D., Boni C., Massari M., Cavallo M.C. Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of *exhausted* HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. *Nat. Med.* 2017;23:327–336

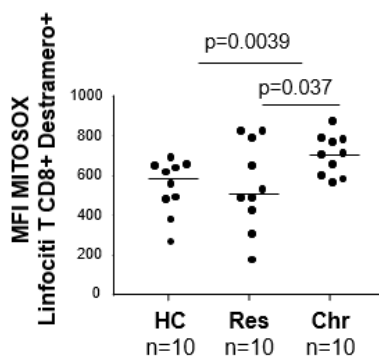


Figura 13. Livelli di anione superossido mitocondriale misurati con l'utilizzo della sonda MitoSOX.

In figura è rappresentato il confronto tra soggetti sani di controllo (HC), soggetti che hanno risolto spontaneamente l'infezione acuta da HBV (Res) e pazienti affetti da epatite B cronica (Chr).

Modificata da: Fisticaro P., Barili V., Montanini B., Acerbi G., Ferracin M., Guerrieri F., Salerno D., Boni C., Massari M., Cavallo M.C. Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of *exhausted* HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. *Nat. Med.* 2017;23:327–336

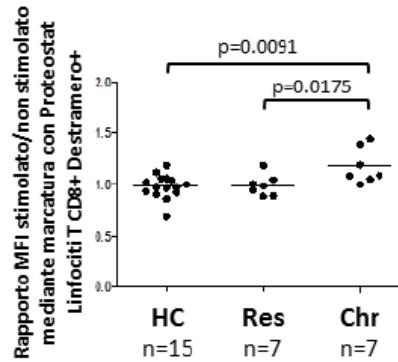


Figura 14. Quantificazione degli aggregati proteici presenti nei linfociti T CD8 virus-specifici di controlli sani (HC) pazienti guariti (Res) e cronici (Chr) utilizzando la sonda fluorescente Proteostat.

La quantità di aggregati proteici è espressa come rapporto tra la mediana dell'intensità di fluorescenza (MFI) della sonda Proteostat rilevata nei campioni stimolati con anti-CD3 e quella rilevata nei campioni non stimolati.

Modificata da: Fisicaro P., Barili V., Montanini B., Acerbi G., Ferracin M., Guerrieri F., Salerno D., Boni C., Massari M., Cavallo M.C. Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of *exhausted* HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. *Nat. Med.* 2017;23:327–336

6.3 Ripristino funzionale linfocitario mediante trattamento con composti antiossidanti specifici per il mitocondrio

Con l'obiettivo di ripristinare le funzioni mitocondriali risultate alterate nei pazienti con infezione cronica da HBV, sono stati testati *in vitro* due composti antiossidanti ad azione selettiva per il mitocondrio: MitoQ e MitoTempo⁴⁶. Il MitoQ svolge un'azione protettiva nei confronti del danno ossidativo. Il principio attivo di tale molecola è l'ubichinone, capace di detossificare il mitocondrio da radicali liberi e altre specie reattive dell'ossigeno (ROS)⁵¹.

Il MitoTempo è anch'esso un antiossidante selettivo per il mitocondrio^{46,52}. In seguito al trattamento *in vitro* dei linfociti T "*exhausted*" con MitoQ si è osservata una significativa riduzione della percentuale di linfociti HBV-specifici depolarizzati (**Figura 15**), dato che indica un miglioramento della funzione del mitocondrio in seguito al trattamento con tale sostanza⁴⁶.

MitoQ e MitoTempo si sono inoltre dimostrati efficaci nel ripristinare le funzioni antivirali dei linfociti T “*exhausted*” in corso di infezione cronica da virus dell’epatite B, valutate mediante marcatura intracellulare delle citochine (ICS) e successiva analisi citofluorimetrica (**Figura 16**)⁴⁶. E’ importante notare che sia MitoQ che MitoTempo promuovono un aumento della produzione di IFN γ , fino al raggiungimento di livelli comparabili con quelli riscontrati nei linfociti T CD8 di 8 soggetti che hanno spontaneamente risolto l’infezione acuta, capaci pertanto di controllare efficacemente l’infezione da HBV (**Figura 16**)⁴⁶.

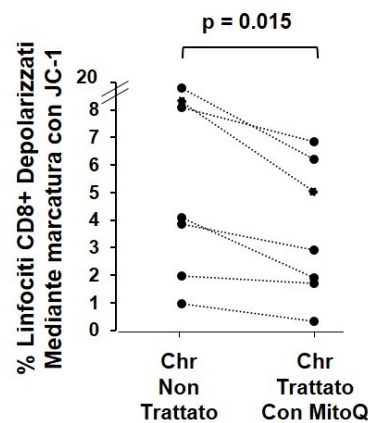


Figura 15. Correzione della disfunzione mitocondriale dei linfociti T di pazienti cronici mediante trattamento con MitoQ.

Il grafico rappresenta la percentuale di linfociti T CD8 di pazienti cronici caratterizzati dalla depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale (valutata mediante marcatura con JC-1), dopo stimolazione con i peptidi della proteina core di HBV, in presenza o assenza di MitoQ nel terreno di coltura.

Modificata da: Fiscaro P., Barili V., Montanini B., Acerbi G., Ferracin M., Guerrieri F., Salerno D., Boni C., Massari M., Cavallo M.C. Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of *exhausted* HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. *Nat. Med.* 2017;23:327–336

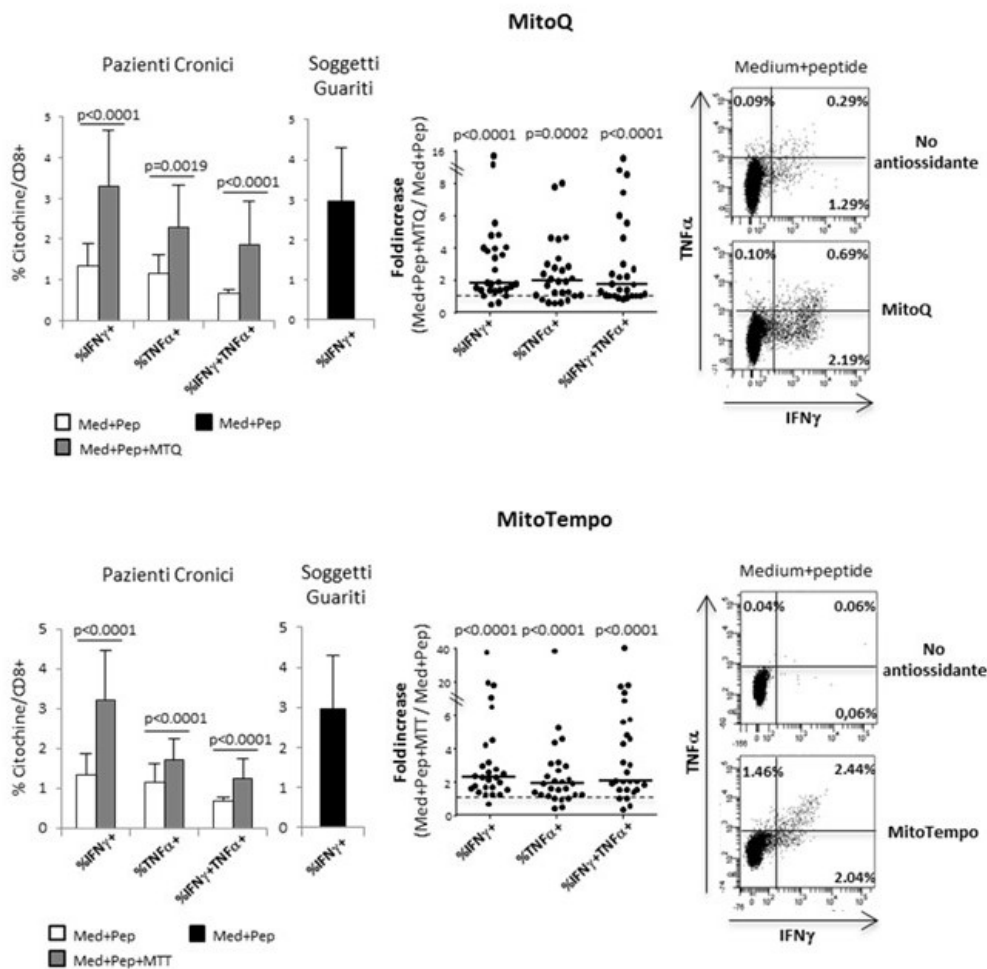


Figura 16. Recupero della risposta antivirale nei linfociti T CD8 di pazienti cronici in seguito a trattamento con antiossidanti specifici per il mitocondrio.

E' illustrata la percentuale di linfociti T CD8 che producono IFN γ , TNF α o entrambe le citochine (IFN γ +TNF α), dopo stimolazione con peptidi della proteina core di HBV, in seguito a coltura delle PBMCs in presenza o in assenza di MitoQ o MitoTempo. In entrambi i pannelli sono rappresentati, a sinistra, i valori medi, accompagnati dai corrispondenti valori di errore standard, delle risposte T linfocitarie in assenza di trattamento (in bianco) e in seguito a trattamento con gli antiossidanti (in grigio). In nero è illustrata la percentuale media di linfociti T CD8 produttori IFN γ riscontrati in soggetti che hanno spontaneamente risolto l'infezione da HBV. Il grafico riportato al centro di ogni pannello illustra l'incremento della produzione di citochine per ciascun paziente in seguito a trattamento con le sostanze antiossidanti (fold increase). E' stata riportata la mediana corrispondente ai valori di fold increase. In entrambi i pannelli i dot plots riportati illustrano un campione rappresentativo.

Modificata da: Fasicaro P., Barili V., Montanini B., Acerbi G., Ferracin M., Guerrieri F., Salerno D., Boni C., Massari M., Cavallo M.C. Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of *exhausted* HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. Nat. Med. 2017;23:327–336

7. Funzioni di mitocondrio e proteasoma nei linfociti T e loro interazioni

Come affermato nel paragrafo precedente, mitocondrio e proteasoma non solo svolgono ruoli cruciali nei processi relativi al metabolismo cellulare, ma sono anche implicati nell'attivazione, differenziazione e nel corretto funzionamento dei linfociti T^{47,53}.

I linfociti T *naive*, in seguito a stimolazione antigenica, passano da uno stato quiescente, caratterizzato da un metabolismo di tipo catabolico, ad uno stato proliferativo in cui il metabolismo diventa anabolico per bilanciare la necessità di ATP con quella di produrre intermediari metabolici, utili per la sintesi di nuove macromolecole. Questo cambiamento è associato ad un robusto incremento del consumo di glucosio e glutammina, necessaria, quest'ultima, per il metabolismo mitocondriale attraverso la glutaminolisi. Studi *in vitro* hanno dimostrato che l'incremento della glicolisi e del metabolismo mitocondriale sono associati con la proliferazione della popolazione T linfocitaria. Infatti, il metabolismo mitocondriale è fondamentale per l'attivazione dei linfociti T, tramite la produzione di una quantità controllata di specie reattive dell'ossigeno (ROS) a livello mitocondriale, necessarie per l'ottimale attività di NFAT, NF-KB e per la via di segnalazione tramite TCR⁴⁷. Al contrario, le cellule T di memoria, sfruttano un metabolismo di tipo catabolico per la produzione di ATP, e presentano, inoltre, un maggior numero di mitocondri e una maggior capacità respiratoria, supportata dalla grande quantità di ATP prodotta tramite ossidazione degli acidi grassi. Come per il mitocondrio, anche l'attività del proteasoma è un importante fattore di regolazione del destino dei linfociti T. Esperimenti *in vitro* hanno mostrato come l'inibizione del proteasoma induca apoptosi in linfociti T attivati, tramite attivazione del *pathway* apoptotico mitocondriale⁵³. Un altro studio ha evidenziato come la riduzione farmacologica dell'attività del proteasoma nelle primissime fasi di differenziamento, induca i linfociti ad

acquisire proprietà caratteristiche dei linfociti T effettori, mentre al contrario la stimolazione del proteasoma sostiene la formazione di cellule memoria⁵³.

Disfunzioni del mitocondrio e del proteasoma sono correlate a molteplici condizioni patologiche, oltre ad essere la principale caratteristica della senescenza cellulare e delle patologie ad essa associate. Infatti, la patogenesi di alcuni disturbi neurodegenerativi quali morbo di Alzheimer e morbo di Parkinson, è caratterizzata da disfunzioni mitocondriali e malfunzionamenti del sistema di *turn-over* proteico mediato dal proteasoma^{54,55}.

Sebbene i mitocondri rappresentino un compartimento esclusivo all'interno della cellula, esistono molteplici evidenze che ne indicano la mutua interazione con il sistema ubiquitina-proteasoma. Infatti quest'ultimo ha un ruolo importante nel controllo qualità delle proteine mitocondriali, influenzandone biogenesi e maturazione. La funzione del proteasoma va quindi oltre quella di rimozione delle proteine danneggiate, in quanto svolge molteplici ruoli: regola la composizione del proteoma mitocondriale, interviene nelle dinamiche organellari, tra cui la rimozione dei mitocondri disfunzionali (mitofagia) e protegge la cellula da danni dovuti a disfunzioni mitocondriali, come l'eccessiva produzione di ROS⁵⁶. D'altra parte è noto che la produzione di ATP da parte del mitocondrio limita l'attività del sistema ubiquitina-proteasoma, che è ATP-dipendente, in particolare per quanto riguarda il processo di ubiquitinazione, così come l'attività della subunità regolatoria 19S⁵⁴. L'interazione tra l'attività mitocondriale e quella del proteasoma è stata ampiamente studiata anche nei linfociti T, dove l'inibizione del proteasoma ha provocato una depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale e l'induzione dell'apoptosi⁵⁷. Inoltre, l'esposizione ad uno stress ossidativo, da parte dei linfociti T, provoca una riduzione dell'attività catalitica del proteasoma, portando ad una minore responsività linfocitaria e ad una situazione paragonabile a quella osservata durante la senescenza cellulare⁵⁸.

8. Composti polifenolici impiegati per lo studio

Con l'obiettivo di identificare strategie di correzione ottimali per il ripristino della funzione T linfocitaria abbiamo ricercato dei composti biologicamente attivi che possano agire simultaneamente sulle funzioni mitocondriali e del proteasoma, le quali si sono confermate alterate nei linfociti "*exhausted*"⁴⁶.

In particolare sono stati selezionati Resveratrolo e Oleuropeina. Entrambi sono composti polifenolici con descritta azione antiossidante. A livello intracellulare essi agiscono su un ampio spettro di bersagli, tra cui è descritta la loro abilità di stimolare la biogenesi mitocondriale e l'attività del proteasoma⁵⁹⁻⁶¹. Sia Resveratrolo che Oleuropeina si sono dimostrati efficaci nell'attivare in modo diretto e indiretto vari meccanismi di protezione mitocondriale e di turnover proteico, ad esempio attraverso l'attivazione di *pathways* derivati dalla fosforilazione di AMPK, l'attivazione delle sirtuine, l'induzione di risposte Nrf2-dipendenti⁶²⁻⁶⁸.

Il Resveratrolo (trans-3,4',5-triidrossistilbene) è un polifenolo, nello specifico uno stilbenoide (derivato idrossilato dello stilbene), presente in natura in piccole quantità nell'uva rossa e nel vino da essa derivato, oltre che in varie famiglie vegetali quali *Cyperaceae*, *Dipterocarpaceae* e *Gnetaceae*. In seguito alla somministrazione *in vivo*, il Resveratrolo si accumula principalmente nel fegato, verso cui mostra elevata affinità⁶⁹.

All'interno dell'organismo il Resveratrolo viene metabolizzato in diversi modi (**Figura 17**)^{69,70}, tra cui:

- Solfatazione in fegato e intestino (resveratrolo-3'-solfato)
- Glucuronidazione del gruppo fenolico: si ottengono due diversi derivati monoglucuronidi (resveratrolo-3'-glucuronide e resveratrolo-4'-glucuronide)

- Idrogenazione del doppio legame alifatico da parte della flora intestinale (di-idro-resveratrolo).

Il Resveratrolo è stato ampiamente studiato come attivatore della sirtuina 1.

SIRT1 è una de-acetilasi NAD-dipendente con il ruolo di regolare l'attività di vari fattori e co-fattori trascrizionali come il soppressore tumorale p53, il *myocyte-specific enhancer factor 2* (MEF2), *forkhead box O* (FOXO) *proteins* e PGC1- α , il quale svolge un ruolo cruciale nel regolare la biogenesi del mitocondrio e le sue funzionalità. In studi effettuati su modelli animali, il Resveratrolo è risultato efficace nell'indurre la biogenesi mitocondriale e nel potenziare il metabolismo ossidativo, inoltre, recenti studi hanno dimostrato che questa sostanza ha proprietà protettive da malattie cardiovascolari, sindromi metaboliche (diabete) e patologie neurodegenerative (Morbo di Parkinson)⁷¹.

Studi sulla malattia di Alzheimer hanno evidenziato la capacità del Resveratrolo di stimolare l'attività del proteasoma, coinvolto nella degradazione delle proteine β -amiloidi⁷².

Recenti studi sull'impiego del Resveratrolo per il trattamento delle malattie neurodegenerative, accompagnati da trials clinici, hanno evidenziato la sicurezza e la buona tollerabilità della molecola per la salute umana⁷³.

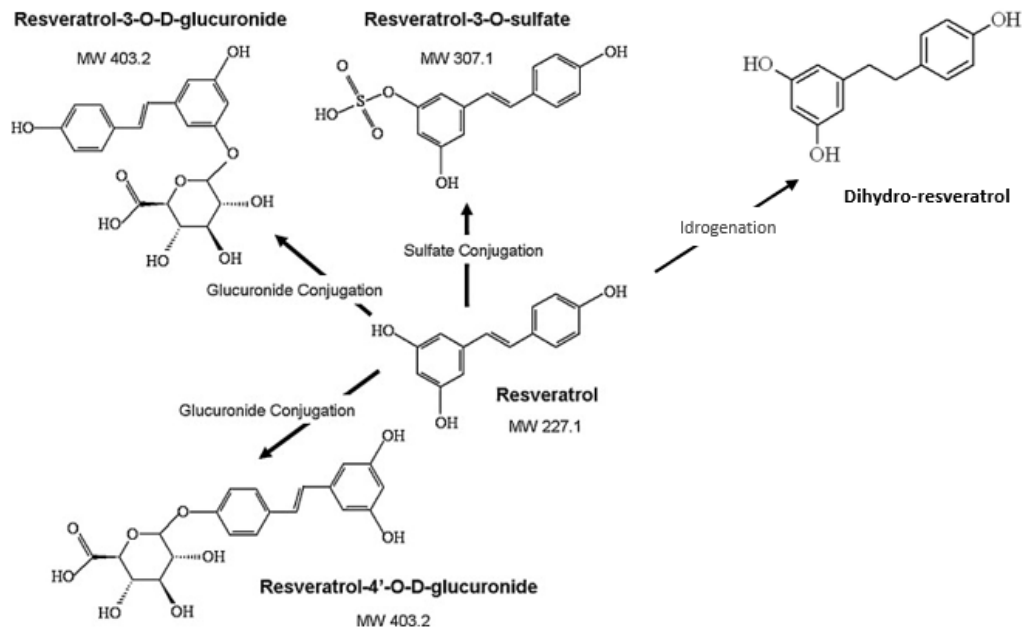


Figura 17. Struttura chimica del Resveratrolo e dei suoi principali metaboliti.

L'Oleuropeina è il principale composto polifenolico presente nelle foglie e nei frutti dell'ulivo; esso si ritrova nell'olio di oliva sia nella forma legata a una molecola di glucosio (glicoside), che nella forma non glicata.

Come il Resveratrolo, anche l'Oleuropeina presenta un'azione antiossidante e viene metabolizzata nei vari distretti dell'organismo in seguito alla somministrazione *in vivo*.

Il principale metabolita dell'Oleuropeina è il 3'-idrossitirosolo, prodotto dall'idrolisi della molecola stessa. Questo derivato è un potente *scavenger* di radicali liberi^{74,75}.

Altri metaboliti dell'Oleuropeina (**Figura 18**), derivati da ulteriori modificazioni chimiche del metabolita principale 3'-Idrossitirosolo, sono^{76,77}:

- 3'-Idrossitirosolo-3'-Glucuronide;
- 3'-Idrossitirosolo-4'-Glucuronide;

- 3'-Idrossitirosolo-4'-solfato.

All'Oleuropeina sono attribuite proprietà benefiche nei confronti di numerose malattie come neoplasie, patologie cardiovascolari, diabete e malattie neurodegenerative. In modelli animali affetti da ipertensione, caratterizzati da disfunzioni mitocondriali e dall'accumulo di ROS nei nuclei paraventricolari dell'ipotalamo (PVN), è stato dimostrato come l'Oleuropeina sia in grado di indurre la biogenesi mitocondriale tramite l'attivazione di PGC-1 α e, grazie alle sue proprietà antiossidanti, di ridurre sostanzialmente il livello dei ROS attivando il *pathway* di Nrf2⁷⁸. Studi sulla senescenza cellulare hanno evidenziato la capacità dell'Oleuropeina di stimolare l'attività proteasomale *in vitro*, tramite l'induzione di cambiamenti conformazionali della subunità 20S. Questi studi hanno infatti dimostrato che, in seguito a stress ossidativo, l'attività di degradazione proteica mediata dal proteasoma sia maggiore in cellule trattate con Oleuropeina rispetto a cellule di controllo non trattate o trattate con altre sostanze⁷⁹. Recenti trials clinici eseguiti su volontari sani hanno dimostrato la buona tollerabilità e l'assenza di effetti collaterali del trattamento con Oleuropeina e con il suo principale metabolita 3'-Idrossitirosolo⁷⁷.

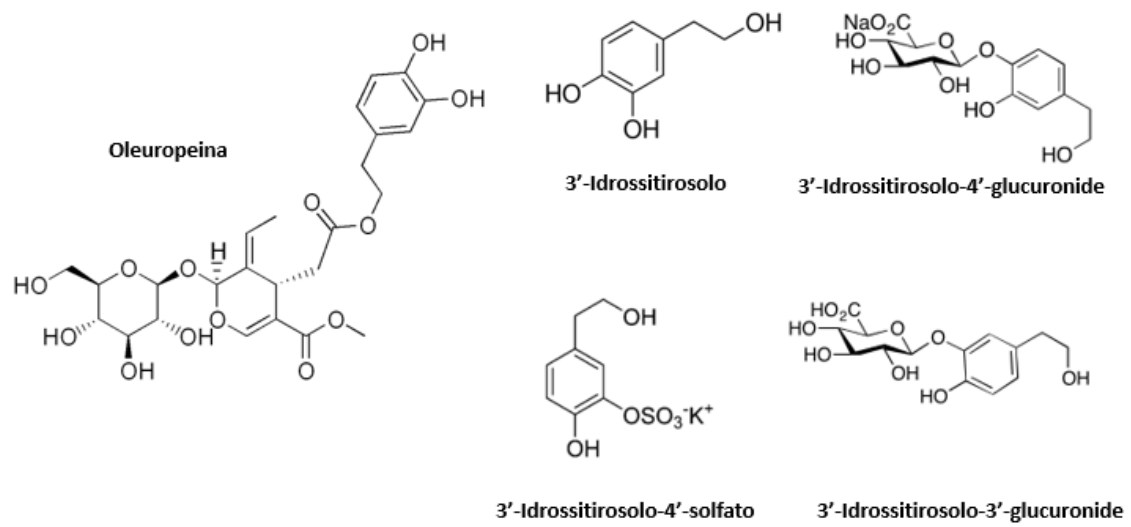


Figura 18. Struttura chimica dell'Oleuropeina e dei suoi principali metaboliti.

SCOPO DELLO STUDIO

Poiché in corso di infezione cronica da virus dell'epatite B le risposte T linfocitarie risultano disfunzionali, con limitata capacità antivirale, contribuendo alla persistenza del virus all'interno dell'organismo ospite²⁵, scopo del progetto è quello di identificare delle strategie di correzione ottimali per il ripristino della funzionalità antivirale T linfocitaria, come possibili terapie immunomodulanti per l'infezione cronica da HBV. L'analisi dei profili trascrizionali eseguita su linfociti T isolati da pazienti con infezione cronica da HBV ha evidenziato una marcata down-regolazione di geni coinvolti in numerosi processi cellulari, tra cui quelli relativi alla funzionalità mitocondriale e al sistema ubiquitina-proteasoma⁴⁶. Studi *in vitro* eseguiti trattando i linfociti T di pazienti con infezione cronica da HBV con composti ad azione antiossidante specifica per l'ambiente mitocondriale (MitoQ e MitoTempo) hanno permesso di ottenere un incremento significativo delle funzionalità antivirali dei linfociti virus-specifici "exhausted"⁴⁶. L'obiettivo del presente studio è quello di identificare composti biologicamente attivi che possano agire simultaneamente sulle funzioni mitocondriali e del proteasoma, le quali si sono confermate alterate nei linfociti CD8+ HBV-specifici di pazienti con infezione cronica⁴⁶. Pertanto è stata testata l'efficacia di due composti polifenolici di origine naturale, Resveratrolo ed Oleuropeina, la cui azione nel promuovere sia la funzionalità mitocondriale, che la proteostasi cellulare è ampiamente descritta in letteratura^{67,78}. Dato che, in seguito all'ingestione, è noto che i composti polifenolici vengono metabolizzati nei vari distretti dell'organismo^{69,76,77}, sono stati testati su colture linfocitarie *in vitro*, parallelamente ai composti originali Resveratrolo e Oleuropeina, anche i principali metaboliti di tali molecole.

Data la potenziale complementarità di azione tra composti polifenolici e antiossidanti mitocondriali, è stato poi valutato l'effetto delle associazioni tra MitoQ e MitoTempo con Oleuropeina e Resveratrolo, con l'obiettivo di rilevare un eventuale effetto sinergico di tali molecole sulla funzionalità antivirale dei linfociti T *"exhausted"*.

MATERIALI E METODI

1. Pazienti e controlli

La popolazione complessiva dei pazienti studiati è stata arruolata presso l'Unità Operativa di Malattie Infettive ed Epatologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, l'Unità Operativa di Malattie Infettive dell'azienda USL-IRCCS di Reggio Emilia e il Distretto di Gastroenterologia ed Epatologia dell'Università di Milano.

In particolare, sono stati reclutati pazienti appartenenti alle seguenti categorie:

- 65 pazienti con epatite cronica attiva da HBV, nessuno dei quali era mai stato sottoposto a terapia. La diagnosi si è basata su livelli elevati di alanina aminotransferasi (ALT) mantenuti per più di sei mesi e positività per HBsAg, anti-HBc, anti-HBe e HBV DNA (**Tabella 1**). Di questi, 32 pazienti erano HLA-A2 positivi. Lo screening per HLA-A2 è stato realizzato mediante marcatura delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) con l'anticorpo fluorescente anti-HLA-A2.01 (BD Biosciences, San Jose, CA) e successiva valutazione mediante analisi citofluorimetrica.

	Sesso (M/F)	Età*	HBV-DNA* (IU/ml)	ALT* (U/L)	Genotipo di HBV	HBeAg negativi	HLA-A2
Pazienti con epatite cronica da HBV	42/23	45 (24-70)	2,96x10 ⁵ (1000-7,4x10 ⁸)	54 (14-379)	44 gen D 2 gen A 2 gen C 17 gen ND	58	32 POS

* è mostrata la mediana e l'intervallo tra il valore minimo e quello massimo rilevato.

Tabella 1. Dettagli clinici dei pazienti con epatite cronica da HBV.

- 6 soggetti, HLA-A2+, di età compresa tra 30 e 60 anni, guariti spontaneamente dall'infezione acuta da HBV, tra 6 e 10 mesi dopo il picco di innalzamento dei livelli sierici di ALT. Essi presentano negatività per HBsAg e positività per anti-HBs.
- 13 soggetti sani HLA-A2+ di età compresa tra 25 e 57 anni, disponibili come gruppo di controllo.

Tutti i pazienti arruolati sono risultati negativi per la ricerca di anticorpi anti-HCV (virus dell'epatite C), virus delta, HIV-1 e HIV-2 (virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 e di tipo 2) e per altri marcatori di epatite virale o autoimmune. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e tutti i soggetti hanno sottoscritto il consenso informato.

2. Peptidi sintetici, complessi destramerici peptide-HLA di classe I e anticorpi

Per stimolare la popolazione cellulare dei linfociti T HBV-specifici *in vitro* sono state utilizzate 7 miscele (**Tabella 2**) contenenti da 39 a 42 peptidi sintetici, della lunghezza di 15 aminoacidi ognuno, con sequenze sovrapposte di 10 residui e corrispondenti all'intera sequenza del genoma di HBV di genotipo D (sintetizzati da Chiron Mimotopes, Victoria, Australia).

Per lo studio della risposta dei linfociti T virus-specifici nei pazienti risultati HLA-A2 positivi sono stati impiegati peptidi sintetici corrispondenti all'epitopo HLA-A2 ristretto della proteina core (aa. 18-27: FLPSDFFPSV) di HBV di genotipo D. Come controllo, è stato selezionato l'epitopo HLA-A2 ristretto corrispondente alla proteina della matrice (GILGFVFTL) del virus dell'influenza A (FLU). Questi peptidi sono stati acquistati da Proimmune (Oxford, UK). I complessi destramerici peptide-HLA di classe I coniugati con i fluorocromi PE o APC, contenenti i peptidi HBV-core (aa 18–27: FLPSDFFPSV), HBV-envelope

(WLSLLVPFV), e FLU-matrice (GILGFVFTL) sono stati acquistati da Immudex (Copenhagen, Denmark)⁸⁰. Per stimolare l'intera popolazione di linfociti T *in vitro* è stato impiegato l'anticorpo monoclonale purificato anti-CD3 LEAF (a basso contenuto di endotossine e privo di azide, clone HIT3a), prodotto da Biolegend (San Diego, Ca). Gli anticorpi utilizzati per la marcatura *in vitro* dei linfociti T sono: anti-CD3-BD Horizon™ PE-CF594 (clone HCHT1), CD3-BD Horizon™ APC-R700 (clone HCHT1), CD8-APC-H7, CD8-Alexa Fluor®700, CD8-PE-Cy7, CD107a-PE-Cy7, IFN- γ -Alexa Fluor®700, IL-2 APC (BD Biosciences); CD3-PE-Cy7 (BioLegend, San Diego, California); TNF- α -FITC, CD4-PE, CD8-PerCP (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), LC3B-Alexa Fluor647 (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Sono state utilizzate le seguenti sonde per valutare la vitalità cellulare: 7-AAD (BD Biosciences) e LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Life Technologies).

Miscela	Regioni Genomiche di HBV	Peptidi	Posizioni Amminoacidiche
1	Core	31-72	1-214
2	Envelope	73-111	1-205
3	Envelope	112-149	196-389
4	Polymerase	150-191	1-220
5	Polymerase	192-233	211-430
6	Polymerase	234-274	421-635
7	Polymerase	275-315	626-832

Tabella 2. Miscele di peptidi utilizzate. Sono indicate le regioni genomiche corrispondenti con i rispettivi peptidi e le posizioni degli amminoacidi.

3. Isolamento dei linfociti del sangue periferico

Le cellule linfomononucleate del sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear, PBMCs) sono state ottenute a partire da sangue fresco eparinato mediante centrifugazione su gradiente di densità Ficoll-Hypaque. Dopo aver eseguito due lavaggi con soluzione HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), la conta delle cellule recuperate è stata determinata mediante colorazione con Türk, utilizzando la camera di Neubauer. In seguito le PBMCs sono state congelate utilizzando un medium di congelamento (Siero Fetale Bovino-FBS 90% e Dimetilsolfossido-DMSO 10%) e sono state crioconservate in azoto liquido fino al momento del loro utilizzo per gli esperimenti.

4. Studio dell'autofagia mediante citometria a flusso

Le cellule mononucleate isolate da sangue periferico (PBMC) di pazienti con infezione cronica da HBV, soggetti guariti spontaneamente da un'infezione acuta e controlli sani, crioconservate in azoto liquido, sono state scongelate, risospese nel medium completo (RPMI completo con 8% di siero umano) ed incubate overnight in presenza o assenza di Cloroquina (30 μ M, Life Technologies). Tale composto inibisce la fusione tra autofagosoma e lisosoma durante il processo autofagico che si verifica fisiologicamente nella cellula. In tal modo, il giorno successivo, è possibile valutare la presenza di autofagosomi nell'ambiente intracellulare. A tale scopo, dopo aver eseguito la marcatura con i complessi destramerici PE-coniugati e con altri marcatori di superficie (anticorpi anti-CD3, CD8), è stato impiegato l'anticorpo anti-LC3B, in seguito a fissazione e permeabilizzazione delle cellule con Fixation/Permeabilization and Permeabilization Buffers (Life Technologies). I campioni sono

stati analizzati mediante citofluorimetro a flusso a otto colori (FACS-Canto, Becton-Dickinson, CA, USA), utilizzando il software FACS-DIVA^{81,82}.

Il processo autofagico è stato indagato ulteriormente mediante l'uso del kit "CYTO-ID Autophagy detection kit" (Enzo Life Sciences, New York, USA). La sonda contenuta in tale kit permette di valutare la presenza di vescicole e monitorare il flusso autofagico all'interno di cellule in cui la degradazione delle vescicole da parte dei lisosomi sia inibita⁸³.

Le cellule (PBMCs) sono state coltivate overnight in presenza o assenza di Cloroquina (30 μ M). In giorno successivo sono state ulteriormente trattate per 4 ore in presenza o assenza di Rapamicina (500 nM), un composto capace di indurre l'autofagia. Dopo aver eseguito la marcatura con i complessi destramerici e gli anticorpi anti-CD3 e CD8, il kit "CYTO-ID Autophagy detection kit" è stato utilizzato secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice.

5. Espansione e trattamento dei linfociti T *in vitro*

Le cellule mononucleate isolate da sangue periferico (PBMC) e crioconservate in azoto liquido, sono state scongelate, risospese nel medium completo e stimulate con i peptidi della proteina core di HBV o con i peptidi HLA-A2 ristretti (ognuno alla concentrazione finale di 1 μ M). Le cellule sono state incubate alla temperatura di 37°C per 10 giorni in presenza o assenza di specifici trattamenti. Per alcuni esperimenti, è stata stimolata l'intera popolazione linfocitaria CD3+ attraverso la deposizione delle PBMCs nei pozzetti di piastre in cui era stato fatto precedentemente adsorbire (coating) l'anticorpo anti-CD3 (10 μ g/ml). Anche in questo caso le cellule sono state incubate a 37°C per 10 giorni in presenza o assenza di specifici composti. Al terzo giorno di coltura cellulare è stata aggiunta l'IL-2 alla concentrazione di 50 U/ml, la quale promuove la proliferazione dei linfociti T.

I composti utilizzati per il trattamento *in vitro* dei linfociti T sono:

- Resveratrolo (e i relativi metaboliti)
- Oleuropeina (e i relativi metaboliti)
- MitoQ
- MitoTEMPO

Il Resveratrolo (trans-3,4,5-triidrossistilbene), acquistato da Sigma, è stato utilizzato alle concentrazioni di 5 e 10 μM . Tra i metaboliti attivi del Resveratrolo sono stati testati: Resveratrolo-solfato, Di-idro-resveratrolo e Resveratrolo-gluconide alle concentrazioni di 2,5, 5, 10 e 20 μM , gentilmente forniti dal Professor Del Rio Daniele del Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie dell'Università di Parma.

L'Oleuropeina, acquistata da Sigma, è stata testata alle concentrazioni da 0,25 e 0,5 μM . Tra i metaboliti attivi di tale composto sono stati selezionati: 3'-Idrossitirosolo (Sigma), 3'-Idrossitirosolo-3'-Glucuronide (TRC Canada), 3'-Idrossitirosolo-4'-Glucuronide (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e 3'-Idrossitirosolo-4'-Solfato (TRC Canada), alle concentrazioni di 0,25 μM e 0,5 μM .

I composti polifenolici Resveratrolo e Oleuropeina sono stati testati sulle colture linfocitarie *in vitro* sia singolarmente che in associazione ai composti antiossidanti specifici per il mitocondrio, MitoQ e MitoTEMPO, precedentemente descritti⁴⁶.

Il MitoQ (BioTrend, Germany) è stato utilizzato alle concentrazioni di 0,1 e 1 μM , il MitoTEMPO (Sigma) alla concentrazione di 100 μM .

6. Blocco del legame PD-1/PD-L1

Le cellule mononucleate isolate da sangue periferico (PBMC) di pazienti con infezione cronica da HBV e crioconservate in azoto liquido, dopo essere state scongelate e risospese

nel medium completo, sono state incubate per 45 minuti con l'anticorpo anti-PD-L1 (5 or 10 µg/ml, Life Technologies). In seguito tali cellule sono state stimulate con i peptidi HBV-specifici e incubate per 10 giorni in presenza o assenza dei composti polifenolici o degli antiossidanti mitocondriali.

7. Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale

L'analisi citofluorimetrica condotta sui linfociti del sangue periferico (PBMC) utilizzando come sonda specifica JC-1 (Life Technologies) ha permesso di quantificare la percentuale di cellule caratterizzate da depolarizzazione della membrana mitocondriale (MMP). I linfociti, dopo stimolazione con la miscela corrispondente al *core* di HBV, sono stati incubati alla temperatura di 37°C per 10 giorni in presenza o assenza dei composti polifenolici Oleuropeina e Resveratrolo. Dopo aver eseguito la marcatura di superficie con gli anticorpi anti-CD3 e anti-CD8 per 15 minuti a temperatura ambiente, le cellule sono state risospese in terreno RPMI con 10% di FCS preriscaldato a 37°C e incubate con la sonda JC-1 (2,5 µg/ml) per 10 minuti a temperatura ambiente, protette dalla luce. In seguito all'aggiunta della sonda di vitalità 7AAD, i campioni sono stati acquisiti ed analizzati mediante citofluorimetro a flusso a otto colori (FACS-Canto II, Becton-Dickinson, CA, USA), utilizzando il software FACS-DIVA. La sonda JC-1 è un colorante cationico fluorescente ad alta affinità per i mitocondri. Tale molecola esiste in forma monomeric, ed emette fluorescenza nella lunghezza d'onda del verde (picco di emissione a circa 527 nm). In presenza di un elevato potenziale di membrana mitocondriale (MMP), si accumula proporzionalmente ad esso all'interno del mitocondrio, dove raggiungendo alte concentrazioni, forma aggregati che emettono fluorescenza nella lunghezza d'onda del rosso (circa 590 nm). In caso di calo del potenziale di membrana mitocondriale (depolarizzazione) si ha la diffusione del colorante nel citoplasma,

di conseguenza il picco di emissione del JC-1 subisce uno *shift*, con passaggio da una fluorescenza rossa ad una verde.⁸⁴ L'analisi svolta ha permesso di confrontare la percentuale di linfociti depolarizzati presenti nel campione non trattato e nei corrispondenti campioni trattati con Oleuropeina o Resveratrolo.

8. Valutazione delle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) citoplasmatiche

Il livello dei ROS citoplasmatici è un importante indicatore dello stress ossidativo cellulare.

Sono state utilizzate due sonde con differente specificità: la sonda Diidroetidio (DHE, Molecular Probes) specifica per l'anione superossido citoplasmatico e la sonda 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA, Molecular Probes) specifica per il perossido d'idrogeno citoplasmatico. La sonda DHE emette fluorescenza blu nel citosol; quando viene ossidata a etidio dall'anione superossido, all'interno della cellula, emette fluorescenza nella lunghezza d'onda del rosso (605 nm). La sonda H2DCFDA nel citoplasma della cellula viene convertita da esterasi intracellulari nel composto non fluorescente H2DCF, il quale viene poi ossidato dal perossido d'idrogeno nel composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceina (DCF).

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) sono state incubate per 10 giorni alla temperatura di 37°C, in seguito a stimolo con la miscela core di HBV, in presenza o assenza di Resveratrolo e Oleuropeina. Le cellule sono state marcate con sonda di vitalità LIVE/DEAD per 10 minuti, in seguito sono state marcate con gli anticorpi di superficie (anti-CD3, -CD8) per 15 minuti a temperatura ambiente; sono state poi incubate con le sonde DHE (1µM,) e H2DCFDA (2µM) per 45 minuti e 20 minuti a 37°C, rispettivamente. La valutazione della mediana di intensità di fluorescenza (MFI) di tali sonde ha permesso di confrontare l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno tra i campioni trattati con composti polifenolici e i corrispondenti campioni non trattati.

9. Quantificazione degli aggregati proteici intracellulari

L'analisi citofluorimetrica condotta sui linfociti T utilizzando il kit "ProteoStat® Aggresome Detection" (Enzo Life Sciences, New York, NY) ha permesso la quantificazione degli aggregati proteici intracellulari. Tale kit contiene molecole fluorescenti che si intercalano nella struttura quaternaria originata in seguito ad aggregazione proteica e ne permette la rilevazione. Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs), stimulate con peptidi corrispondenti alla regione core di HBV, sono state incubate per 10 giorni alla temperatura di 37°C in presenza o assenza di trattamento con i composti polifenolici. Dopo aver sottoposto le cellule alla marcatura con anticorpi anti-CD3 e anti-CD8 per 15 minuti a temperatura ambiente, fissazione (Citofix, BD) e permeabilizzazione (TritonX 0,5%), è stato utilizzato il kit "ProteoStat® Aggresome Detection" (Enzo Life Sciences, New York, NY). I campioni sono stati acquisiti ed analizzati mediante citofluorimetro a flusso a otto colori (FACS-Canto II, Becton-Dickinson, CA, USA), utilizzando il software FACS-DIVA.

La quantità di aggregati proteici presenti nei campioni analizzati è stata determinata confrontando la mediana dell'intensità di fluorescenza (MFI) rilevata nei campioni trattati con i composti polifenolici e quella rilevata nei corrispondenti campioni non trattati.

10. Valutazione della degranolazione e della produzione di citochine intracellulari (ICS)

Lo studio della produzione di citochine intracellulari e della degranolazione è stato realizzato sui linfociti T, dopo 10 giorni di espansione *in vitro* in presenza dei peptidi virali (alla concentrazione finale di 1 µM) oppure dopo 6 giorni di espansione *in vitro* in presenza di stimolo con l'anticorpo anti-CD3, in presenza o assenza di specifici trattamenti.

La valutazione della capacità di degranulazione è stata eseguita mediante marcatura con l'anticorpo anti-CD107a, la cui espressione è proporzionale alla capacità citotossica dei linfociti T CD8+. Il giorno dell'esperimento le linee cellulari sono state ri-stimate con i peptidi virali (oppure con anticorpo anti-CD3) e marcate con l'anticorpo anti-CD107a; dopo un'ora sono stati aggiunti 10 µg/ml di Brefeldina-A per ulteriori 3 ore di incubazione, al fine di bloccare la secrezione delle citochine prodotte da parte delle cellule. Al termine, le cellule accuratamente lavate con PBS 1X (Phosphate buffered saline), sono state colorate con gli opportuni marcatori di superficie. Sono state poi fissate e permeabilizzate, (Medium A e Medium B, Nordic MUBio, Susteren Olanda) per consentire la reazione delle citochine intracellulari con gli anticorpi monoclonali anti-IFN γ , anti-TNF α e anti-IL2, incubati con le cellule per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo opportuno lavaggio con PBS 1X, si è proceduto all'analisi mediante citometria a flusso.

11. Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state eseguite con il software GraphPad Prism.

I test impiegati per i confronti sono stati il test U di Mann-Whitney e il test di Wilcoxon per dati appaiati. Prima di ogni confronto è stato valutato se i dati ottenuti seguono una distribuzione normale, utilizzando il test Kolmogorov-Smirnov. L'entità dell'aumento, o fold change (FC), della produzione di citochine da parte delle cellule trattate con i differenti composti (FC \neq 1) è stato valutato con il test di Wilcoxon per ranghi.

RISULTATI

1. I linfociti T HBV-specifici di pazienti con infezione cronica presentano un processo di autofagia alterato

Dall'analisi di espressione genica precedentemente svolta e dalle successive validazioni funzionali eseguite mediante citometria a flusso è emersa la presenza di una disfunzione nei processi di proteostasi dei linfociti T HBV-specifici di pazienti con infezione cronica⁴⁶. Per indagare ulteriormente tali processi, abbiamo analizzato il processo autofagico di tali cellule, a confronto con linfociti T HBV-specifici funzionalmente efficienti di pazienti che hanno spontaneamente risolto un'epatite acuta (guariti) e quelli influenza(FLU)-specifici di soggetti sani. Data la bassa frequenza di linfociti T virus-specifici rilevabili nel sangue periferico di pazienti con infezione cronica da HBV, molte delle tecnologie frequentemente impiegate per lo studio dell'autofagia non possono essere impiegate nel nostro modello, pertanto abbiamo utilizzato specifiche sonde rilevabili mediante citometria a flusso⁸⁵.

Con l'obiettivo di indagare il flusso autofagico fisiologicamente presente nell'ambiente intracellulare, le PBMCs di pazienti con infezione cronica, pazienti guariti e soggetti sani, sono state incubate a 37°C *overnight* in presenza o assenza di cloroquina. La cloroquina inibisce la fusione tra autofagosoma e lisosoma, in modo tale da impedire la degradazione dell'autofagosoma e permetterne la visualizzazione.⁸² A tale scopo è stata valutata l'espressione di LC3B, un marcatore di autofagia espresso sulla superficie degli autofagosomi⁸³. Come è possibile osservare in **Figura 19**, i linfociti T HBV-specifici di pazienti con infezione cronica, in seguito al trattamento con cloroquina, mostrano un'espressione di LC3B significativamente inferiore rispetto ai linfociti T HBV-specifici di pazienti guariti da

un'infezione acuta e linfociti T FLU-specifici di controlli sani. Le mediane dei valori di incremento (Fold Change) sono: 1,079 per i pazienti cronici, 1,341 per i pazienti guariti, 1,335 per i soggetti sani. Questi dati suggeriscono un livello ridotto di autofagia nei linfociti T "exhausted".

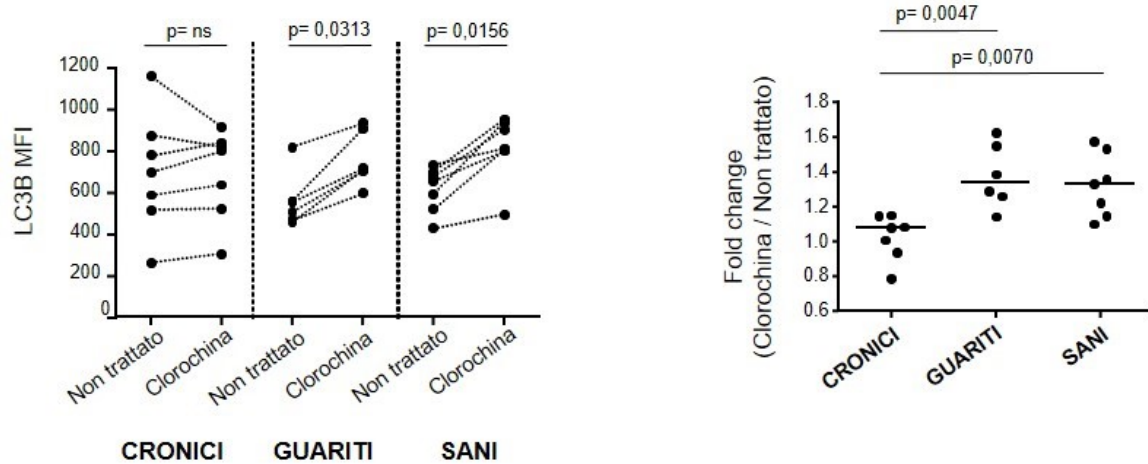


Figura 19. Valutazione del flusso autofagico mediante marcatura con l'anticorpo anti-LC3B, in linfociti HBV-specifici di pazienti cronici, guariti e nei linfociti FLU-specifici di controlli sani.

Nel grafico riportato a sinistra sono indicati i valori di MFI (Median Fluorescence Intensity) dell'anticorpo anti-LC3B nei campioni non trattati e in quelli trattati *overnight* con cloroquina. L'analisi statistica è stata eseguita applicando il test di Wilcoxon per dati appaiati. Il grafico di destra mostra i valori di incremento (Fold Change) dell'espressione di LC3B in seguito al trattamento con cloroquina, nelle diverse categorie di pazienti. Le analisi statistiche sono state eseguite applicando il test U di Mann-Whitney.

Con l'obiettivo di indagare ulteriormente tale disfunzione è stata impiegata la sonda CYTO-ID, capace di marcare le vescicole derivate dal processo autofagico (pre-autofagosomi, autofagosomi, autofagolisosomi)⁸³. PBMCs di pazienti con infezione cronica e soggetti sani, sono state incubate a 37°C *overnight* in presenza o assenza di cloroquina. Il giorno successivo

sono state incubate per altre 4 ore in presenza o assenza di rapamicina, un induttore di autofagia⁸⁵. Come è possibile osservare in **Figura 20**, in seguito al trattamento con cloroquina i linfociti T HBV-specifici di pazienti con infezione cronica hanno riportato una ridotta quantità di vescicole autofagiche rispetto ai linfociti dei controlli sani, confermando la presenza di un processo autofagico disfunzionale nei linfociti “*exhausted*” di pazienti cronici. In presenza di rapamicina si osserva un leggero aumento dell’espressione della sonda CYTO-ID, il quale indica l’avvenuta induzione del processo di autofagia da parte di tale molecola, anche nei linfociti dei pazienti cronici. L’entità di tale incremento risulta essere significativamente minore nei pazienti cronici, rispetto ai controlli sani (la mediana di intensità di fluorescenza è di 1,91 per i pazienti cronici e 2,72 per i controlli sani).

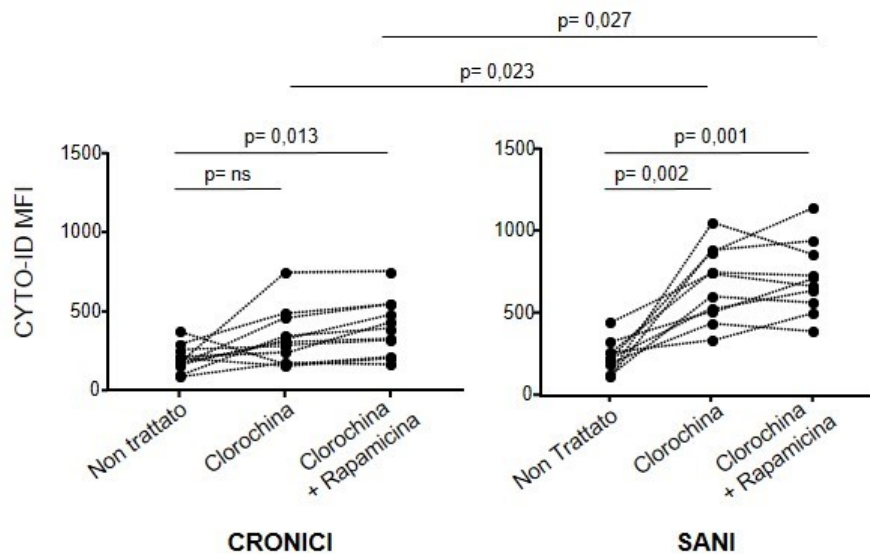


Figura 20. Valutazione del flusso autofagico mediante marcatura con la sonda CYTO-ID, in linfociti HBV-specifici di pazienti cronici e linfociti FLU-specifici di controlli sani.

Nei grafici sono riportati i valori di MFI (Median Fluorescence Intensity) della sonda CYTO-ID nei campioni non trattati, trattati con cloroquina, trattati con cloroquina e rapamicina, nelle due differenti categorie di pazienti.

L’analisi statistica è stata eseguita applicando il test di Wilcoxon per dati appaiati.

2. Il trattamento con Resveratrolo e Oleuropeina migliora le funzioni mitocondriali e del proteasoma dei linfociti “*exhausted*”

E' stata valutata l'efficacia del trattamento con i composti polifenolici selezionati, Resveratrolo e Oleuropeina, nel ripristinare le funzioni mitocondriali e del proteasoma nei linfociti “*exhausted*” dei pazienti con infezione cronica da HBV.

Sono state coltivate *in vitro* linee cellulari di linfociti T di pazienti con infezione cronica, generate in seguito a stimolazione delle PBMCs con peptidi corrispondenti alla proteina *core* di HBV. Le cellule sono state incubate per 10 giorni in presenza o assenza di Resveratrolo (RSV, 5-10 μ M) o Oleuropeina (OLE, 0,25-0,5 μ M). Il decimo giorno è stata valutata la funzionalità mitocondriale, mediante analisi del potenziale di membrana mitocondriale e della presenza di specie reattive dell'ossigeno, e la funzionalità del proteasoma, mediante quantificazione degli aggregati proteici intracellulari.

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato valutato utilizzando la sonda fluorescente JC-1. Come è possibile osservare in **Figura 21**, il trattamento con i composti polifenolici riduce in modo significativo la percentuale di cellule CD8+ caratterizzate dalla depolarizzazione della membrana mitocondriale, se confrontate con i corrispondenti campioni non trattati.

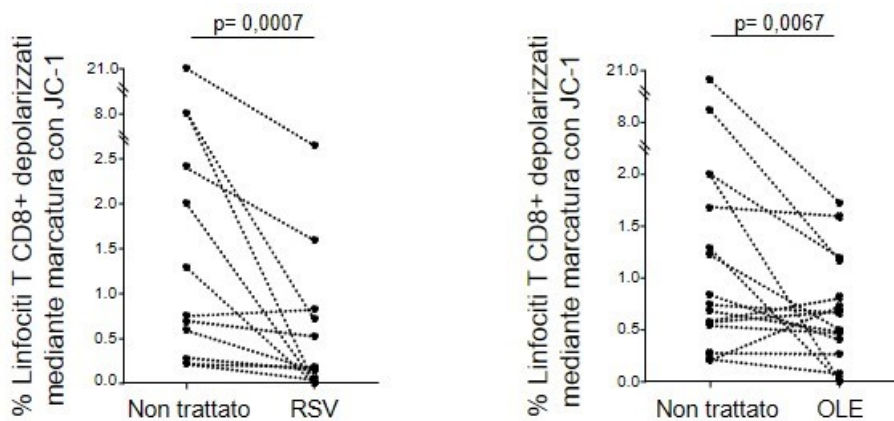


Figura 21. Correzione della disfunzione mitocondriale dei linfociti T di pazienti con infezione cronica mediante trattamento con Resveratrolo (RSV) o Oleuropeina (OLE).

I grafici riportano la percentuale di linfociti T CD8+ di pazienti cronici caratterizzati dalla depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale (valutata mediante marcatura con JC-1), dopo stimolazione con i peptidi della proteina core di HBV, in presenza o assenza di Resveratrolo (a sinistra) o Oleuropeina (a destra) nel terreno di coltura. La differenza statistica tra i campioni trattati e quelli non trattati è stata analizzata applicando il test di Wilcoxon per dati appaiati.

Nelle stesse linee cellulari, generate a partire da PBMCs di pazienti con infezione cronica da HBV, è stata valutato il livello di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nell'ambiente intracellulare in seguito al trattamento con i composti polifenolici. A tale scopo sono state impiegate due sonde fluorescenti: DHE, specifica per l'anione superossido, e H2DCFDA, specifica per il perossido di idrogeno (H2O2). Come è possibile osservare in **Figura 22**, sia il trattamento con Resveratrolo (RSV) che il trattamento con Oleuropeina (OLE) riducono in modo significativo il livello di ROS presenti nell'ambiente citoplasmatico, rispetto ai corrispondenti campioni non trattati.

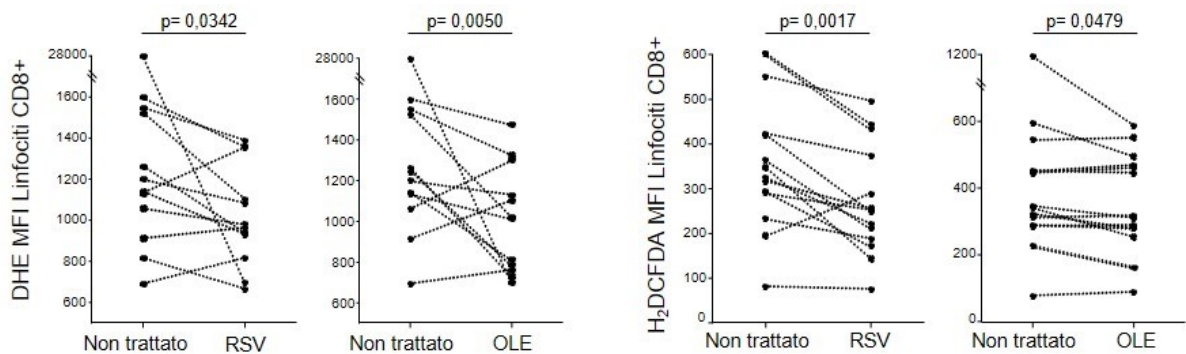


Figura 22. Riduzione dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei linfociti T di pazienti con infezione cronica mediante trattamento con Resveratrolo (RSV) o Oleuropeina (OLE).

I grafici riportano i valori di mediana dell'intensità di fluorescenza (MFI) delle sonde DHE e H2DCFDA nei linfociti T CD8+ non trattati e trattati con Resveratrolo (RSV) o Oleuropeina (OLE).

A sinistra sono riportati i grafici relativi alla riduzione dei livelli di anione superossido, valutata mediante marcatura con la sonda DHE. A destra i grafici riportano la riduzione dei livelli di perossido di idrogeno, valutata mediante marcatura con la sonda H2DCFDA.

La differenza statistica tra i campioni trattati e quelli non trattati è stata analizzata applicando il test di Wilcoxon per dati appaiati.

Con l'obiettivo di valutare il ripristino dell'attività del proteasoma in seguito al trattamento con i composti polifenolici, sono state coltivate *in vitro* linee cellulari di linfociti T di pazienti con infezione cronica, generate in seguito a stimolazione delle PBMCs con peptidi corrispondenti alla proteina core di HBV. Le cellule sono state incubate per 10 giorni in presenza o assenza di Resveratrolo (RSV, 5-10 μ M) o Oleuropeina (OLE, 0,25-0,5 μ M). Il decimo giorno è stata analizzata la funzionalità proteasomale mediante marcatura con il kit "ProteoStat® Aggresome Detection", che permette di identificare in modo specifico, tramite analisi citofluorimetrica, la presenza di aggregati proteici intracellulari. Gli aggregati proteici si originano nelle cellule a partire da proteine denaturate a causa di vari tipi di stress, come

eccessivi sbalzi termici, infezioni virali o esposizione a specie reattive dell'ossigeno. Tali aggregati si accumulano nelle cellule in caso di malfunzionamento del processo di ubiquitinazione e successiva degradazione dei polipeptidi nel proteasoma⁴⁸.

Com'è possibile osservare in **Figura 23**, il trattamento con i composti polifenolici riduce in modo significativo l'accumulo di aggregati proteici intracellulari, suggerendo quindi un recupero dell'efficienza dei processi di proteostasi intracellulare, rispetto ai corrispondenti campioni non trattati.

Questi risultati, complessivamente, suggeriscono che Resveratrolo e Oleuropeina migliorano le funzionalità mitocondriali e del proteasoma dei linfociti T "exhausted" di pazienti con infezione cronica da HBV.

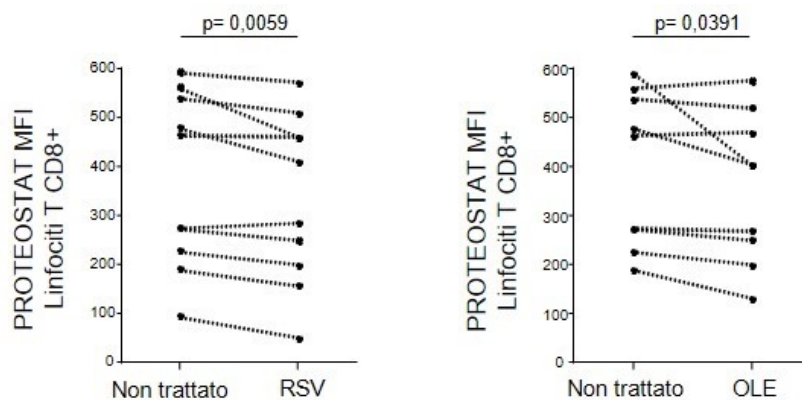


Figura 23. Quantificazione degli aggregati proteici intracellulari nei linfociti T di pazienti con infezione cronica in seguito al trattamento con Resveratrolo (RSV) o Oleuropeina (OLE).

I grafici riportano i valori di mediana dell'intensità di fluorescenza (MFI) della sonda ProteoStat nei linfociti T CD8+ non trattati e trattati con Resveratrolo (RSV, a sinistra) o Oleuropeina (OLE, a destra).

La differenza statistica tra i campioni trattati e quelli non trattati è stata analizzata applicando il test di Wilcoxon per dati appaiati.

3. Recupero della funzione antivirale dei linfociti T HBV-specifici di pazienti con infezione cronica, in seguito al trattamento con i composti polifenolici

E' stata valutata la capacità dei composti polifenolici, Resveratrolo e Oleuropeina, di ripristinare le funzioni antivirali dei linfociti T "exhausted" in corso di infezione cronica da virus dell'epatite B. Sono state coltivate *in vitro* linee cellulari di linfociti T, generate in seguito a stimolazione delle PBMCs con peptidi corrispondenti alla proteina core di HBV. Le cellule isolate da 46 pazienti con infezione cronica da HBV sono state incubate in presenza o assenza di Resveratrolo (RSV, 5-10 μ M), mentre le cellule isolate da 34 pazienti con epatite B cronica sono state incubate in presenza o assenza di Oleuropeina (OLE, 0,25-0,5 μ M). Il decimo giorno è stata valutata la capacità di degranulazione, mediante analisi dell'espressione di CD107a, e la capacità di produrre IFN γ , TNF α e IL-2 in risposta a stimolazione con i peptidi HBV-specifici, attraverso marcatura intracellulare delle citochine (ICS) e successiva analisi tramite citometria a flusso. Dai risultati ottenuti è emerso che i composti polifenolici promuovono un aumento statisticamente significativo sia dell'espressione di CD107a che della produzione di citochine antivirali da parte dei linfociti virus-specifici, rispetto alle cellule non trattate.

In particolare, il trattamento con Resveratrolo induce un incremento medio di 5,3- 2,8- 3,4- volte per IFN γ , TNF α e IL-2 rispettivamente (**Figura 24A**). Inoltre, nei campioni trattati con Resveratrolo si osserva un incremento superiore a 1,5 volte della produzione di IFN γ , TNF α e IL-2 nel 63%, 60,8% e 65,8% dei pazienti testati rispettivamente, in confronto ai corrispondenti campioni non trattati (**Figura 24A**). Il trattamento con Oleuropeina induce un incremento medio di 8,3- 5,1- 2,1- volte per IFN γ , TNF α e IL-2 rispettivamente (**Figura 24B**). Inoltre nei campioni trattati con Oleuropeina si osserva un incremento superiore a 1,5 volte della produzione di IFN γ , TNF α e IL-2 nel 55,8%, 50% e 48,3% dei pazienti testati

rispettivamente, in confronto ai corrispondenti campioni non trattati (**Figura 24B**). Abbiamo poi considerato l'ammontare di linfociti T CD8 capaci di produrre sia IFN γ che TNF α , i quali sono correlati ad una maggiore capacità del sistema immunitario di controllare l'infezione virale⁸⁶.

Sia Resveratrolo che Oleuropeina inducono un incremento significativo della percentuale di tali cellule rispetto ai corrispondenti campioni non trattati, evidenziando un incremento medio di 4,4- e 7,9- volte rispettivamente (**Figura 24**).

Per quanto riguarda la capacità di degranulazione, abbiamo valutato l'espressione di CD107a, e possiamo osservare in **Figura 24** che essa risulta significativamente incrementata in seguito al trattamento con Resveratrolo (**Figura 24A**) o Oleuropeina (**Figura 24B**).

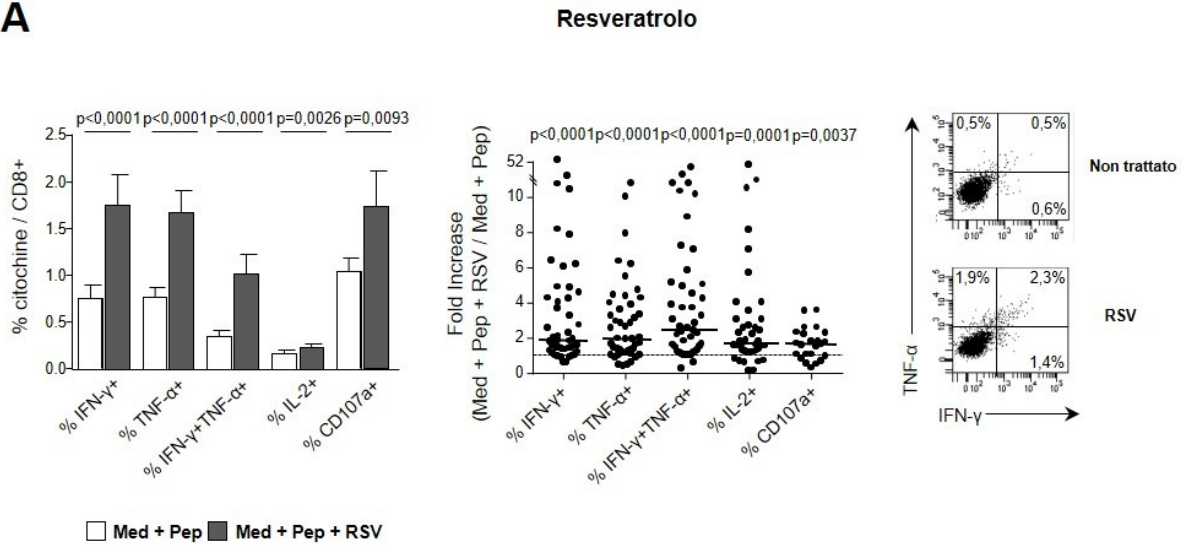
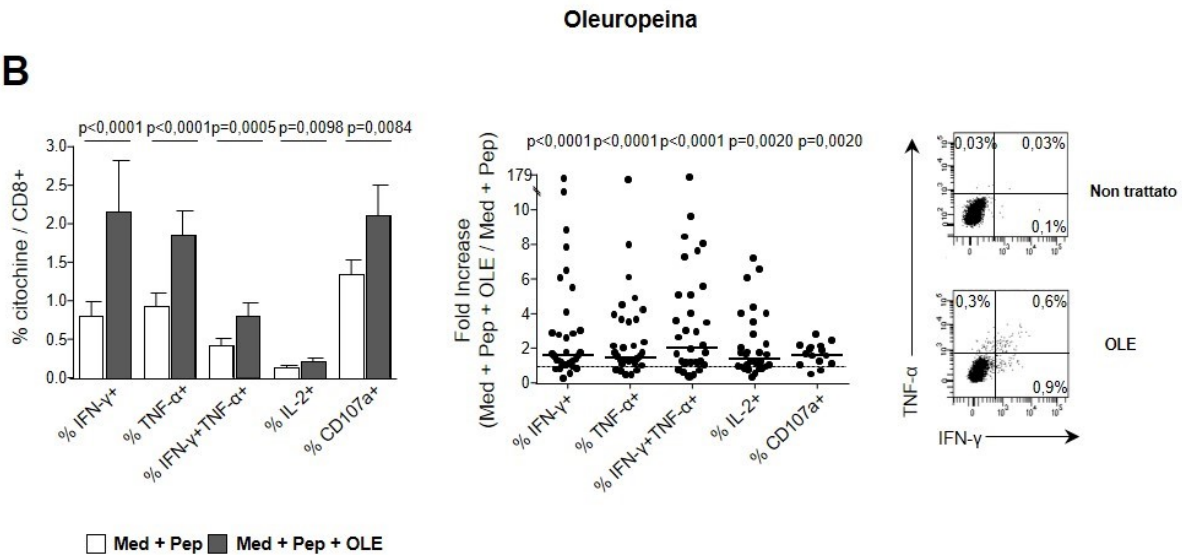
A**B**

Figura 24. Recupero della risposta antivirale nei linfociti T CD8+ di pazienti cronici in seguito al trattamento con Resveratrolo (RSV) o Oleuropeina (OLE)

E' illustrata la percentuale di linfociti T CD8+ che producono IFN γ , TNF α , entrambe le citochine (IFN γ +TNF α +), IL-2 e che esprimono il marcatore di citotossicità CD107a, dopo stimolazione con peptidi della proteina core di HBV, in seguito a coltura delle PBMCs in presenza o in assenza di Resveratrolo (pannello A, N=46) o Oleuropeina (pannello B, N=34).

In entrambi i pannelli sono rappresentati, a sinistra, i valori medi, accompagnati dai corrispondenti valori di errore standard, delle risposte T linfocitarie in assenza di trattamento (in bianco) e in seguito al trattamento con i composti polifenolici (in grigio). Per l'analisi statistica è stato applicato il test di Wilcoxon per dati appaiati. Il grafico riportato al centro di ogni pannello illustra l'incremento della produzione di citochine per ciascun paziente in seguito al trattamento con i composti polifenolici (fold increase). E' stata riportata la mediana corrispondente ai valori di fold increase. L'analisi statistica è stata effettuata applicando il test dei ranghi di Wilcoxon, confrontando i valori di fold change con il valore teorico di 1, che indica assenza di effetto. In entrambi i pannelli i dot plots riportati illustrano un campione rappresentativo.

E' stato poi considerato il comportamento dell'intera popolazione di linfociti T CD3+ degli stessi pazienti con infezione cronica da HBV, allo scopo di controllare l'effetto dei composti polifenolici sulla popolazione globale di linfociti virus-specifici, ossia responsivi allo stimolo virus-specifico rappresentato dai peptidi corrispondenti alla proteina *core* di HBV. Com'è possibile osservare in **Figura 25**, i risultati osservati sono analoghi a quelli precedentemente mostrati per i linfociti T CD8+.

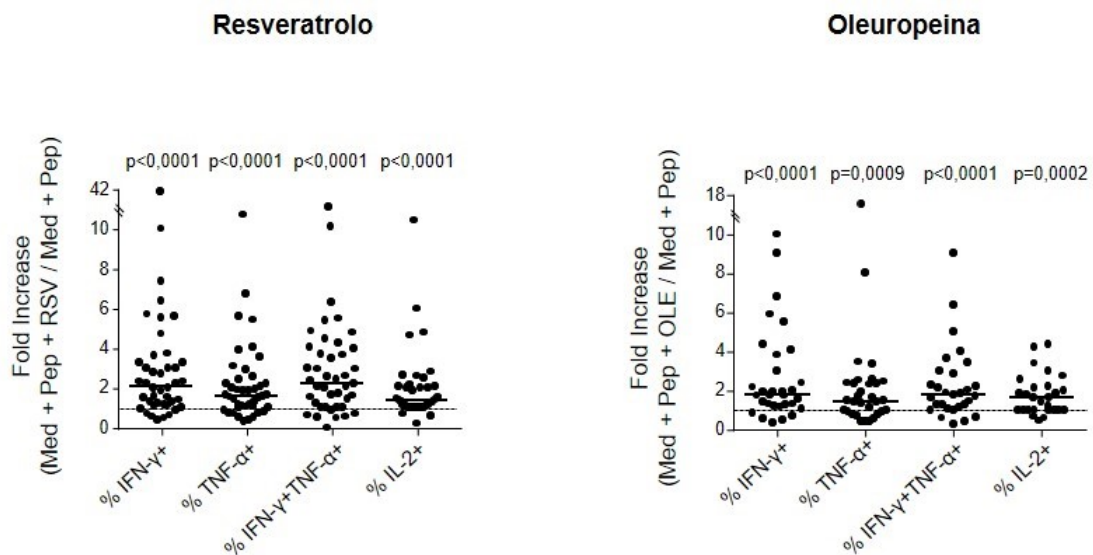


Figura 25. Recupero della risposta antivirale nell'intera popolazione di linfociti T (CD3+) di pazienti cronici in seguito al trattamento con Resveratrolo (RSV) o Oleuropeina (OLE)

I grafici riportano l'incremento (fold increase) nei livelli di linfociti T che producono citochine in seguito al trattamento con Resveratrolo (a sinistra) e Oleuropeina (a destra), per ogni singolo paziente cronico considerato, dopo stimolazione con i peptidi della proteina core di HBV. Per ogni colonna è riportata la mediana corrispondente ai valori di fold increase. L'analisi statistica è stata effettuata applicando il test dei ranghi di Wilcoxon.

4. Confronto tra differenti composti impiegati per il ripristino della funzione antivirale dei linfociti T di pazienti con infezione cronica da HBV

In **Figura 26** è possibile osservare la produzione di citochine, IFN γ e TNF α , da parte di linfociti T HBV-specifici di pazienti con infezione cronica in seguito al trattamento per 10 giorni con differenti composti impiegati per il ripristino funzionale dei linfociti “*exhausted*”.

In particolare sono stati confrontati i composti polifenolici, Resveratrolo e Oleuropeina, i composti antiossidanti precedentemente descritti, MitoQ e MitoTempo⁴⁶, e l’anticorpo anti-PD-L1, il quale blocca il legame inibitorio tra PD-1 e PD-L1.

Il trattamento con l’anticorpo anti-PD-L1 risulta essere meno efficiente nel promuovere la produzione di IFN γ e TNF α rispetto agli altri composti considerati (**Figura 26**).

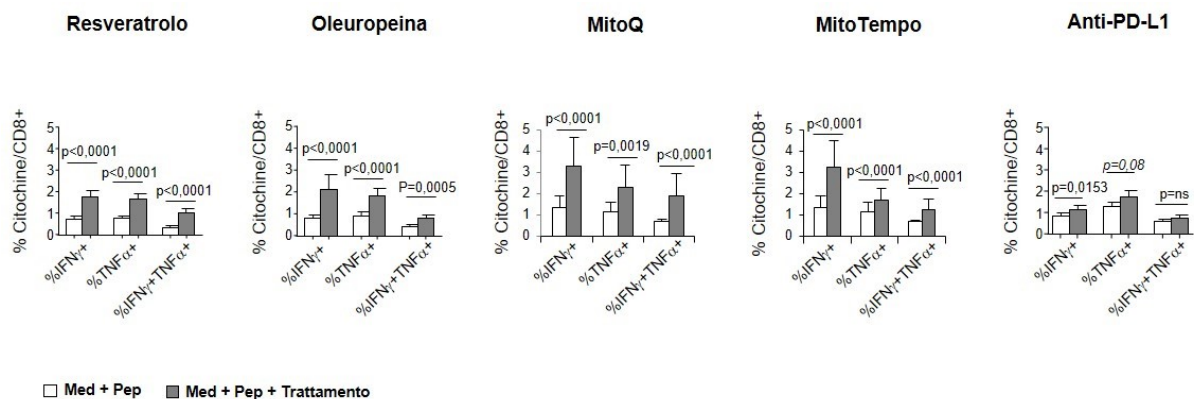


Figura 26. Produzione di citochine osservata nei linfociti T di pazienti con infezione cronica da HBV in seguito al trattamento con differenti composti

I grafici riportano la percentuale di linfociti T CD8+ che producono IFN γ , TNF α oppure entrambe le citochine, in linee cellulari coltivate *in vitro* in presenza di stimolo HBV-specifico e in presenza (barre grigie) o assenza (barre bianche) di Resveratrolo (46 pazienti), Oleuropeina (34 pazienti), MitoQ (27 pazienti), MitoTempo (27 pazienti) o Anti-PD-L1 (20 pazienti). Nei grafici è indicata la media e l’errore standard relativi alla risposta osservata.

L’analisi statistica è stata effettuata applicando il test Wilcoxon per dati appaiati.

5. Recupero della funzione antivirale dei linfociti T HBV-specifici in seguito al trattamento con i metaboliti dei composti polifenolici

Data la bassa biodisponibilità orale e il rapido metabolismo di Resveratrolo e Oleuropeina, esiste il rischio che il loro eventuale impiego nella pratica clinica possa risultare poco efficace, nonostante essi abbiano dato buoni risultati nel ripristinare le funzioni mitocondriali, del proteasoma ed antivirali dei linfociti HBV-specifici di pazienti con infezione cronica. Per rispondere a questo quesito abbiamo quindi proseguito lo studio testando *in vitro* l'efficacia dei principali metaboliti di Resveratrolo e Oleuropeina. E' noto che il Resveratrolo, dopo l'assunzione orale, venga rapidamente convertito nelle forme di Resveratrolo-3-solfato e Resveratrolo-3-glucuronide per effetto degli enzimi UDP-glucuronosil-trasferasi e sulfotrasferasi negli enterociti e negli epatociti.⁷⁰ A livello intestinale il Resveratrolo non assorbito è ulteriormente metabolizzato nella forma di Diidroresveratrolo, per opera della microflora intestinale⁷⁰. Per quanto riguarda l'Oleuropeina, essa viene rapidamente degradata nella forma di Idrossitirosolo dopo l'amministrazione orale⁷⁶. I principali metaboliti dell'Idrossitirosolo che si ritrovano nel plasma e nelle urine dopo l'assunzione orale di Oleuropeina sono la forma solfatata e glucuronidata⁷⁷. Abbiamo testato *in vitro* l'efficacia dei principali metaboliti di Resveratrolo e Oleuropeina nel ripristinare le funzioni antivirali dei linfociti CD8+ "exhausted" di 17 pazienti con infezione cronica da HBV. Le PBMCs isolate da tali pazienti sono state coltivate per 10 giorni *in vitro* in presenza di uno stimolo con i peptidi HBV-specifici e in presenza o assenza di Resveratrolo (RSV), RSV-3-solfato, Diidroresveratrolo, RSV-3-glucuronide, Oleuropeina (OLE), Idrossitirosolo (HT), HT-3-glucuronide, HT-4-glucuronide, HT-3-solfato. Il trattamento con i metaboliti sopra elencati ha indotto un significativo incremento nella produzione di citochine (IFN- γ and TNF- α) e nella frequenza di linfociti T CD8+ capaci di produrre entrambe

le citochine. Tali composti hanno indotto un incremento paragonabile a quello che si osserva in seguito al trattamento con Resveratrolo e Oleuropeina (**Figura 27**). Nella **Tabella 3** sono riportati i dati relativi all'incremento osservato per le citochine considerate, indotto dal trattamento con i metaboliti di Resveratrolo (**Pannello A**) e Oleuropeina (**Pannello B**).

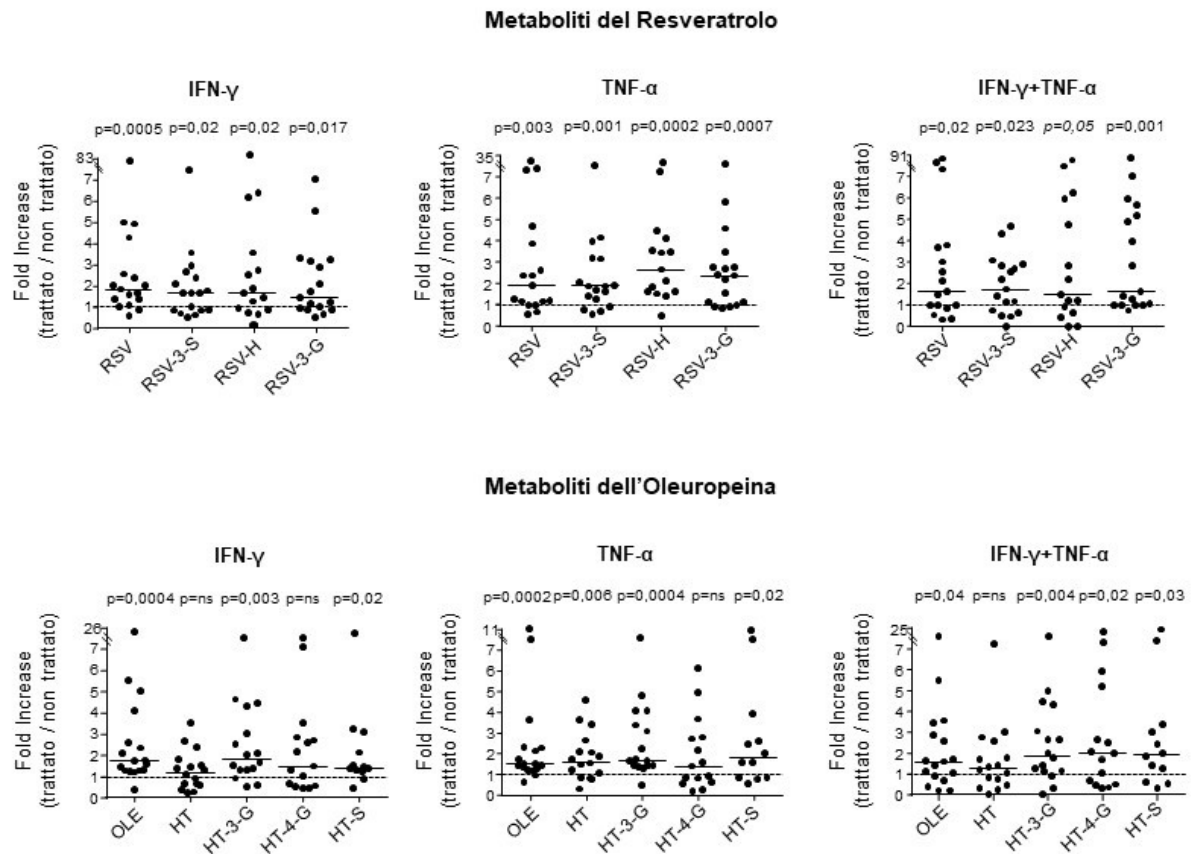


Figura 27. Recupero della risposta antivirale dei linfociti T CD8+ HBV-specifici di pazienti cronici in seguito al trattamento con i metaboliti di Resveratrolo (RSV) e Oleuropeina (OLE)

I grafici riportano l'incremento (fold increase) nei livelli di linfociti T che producono IFN- γ , TNF- α o entrambe le citochine (IFN- γ +TNF- α), in seguito al trattamento con i metaboliti del Resveratrolo (sopra) e con i metaboliti dell'Oleuropeina (sotto), per ogni singolo paziente cronico considerato, dopo stimolazione con i peptidi della proteina core di HBV. I metaboliti del Resveratrolo (RSV) che sono stati testati sono: Resveratrolo-3-solfato (RSV-3-S), Diidroresveratrolo (RSV-H), Resveratrolo-3-glucuronide (RSV-3-G). I metaboliti dell'Oleuropeina (OLE) che sono stati testati sono: Idrossitirosolo (HT), Idrossitirosolo-3-glucuronide (HT-3-G), Idrossitirosolo-4-glucuronide (HT-4-G), Idrossitirosolo-solfato (HT-S). Per ogni colonna è riportata la mediana corrispondente ai valori di fold increase. L'analisi statistica è stata effettuata applicando il test dei ranghi di Wilcoxon.

A	RESVERATROLO-3-SOLFATO		DIIDRORESVERATROLO		RESVERATROLO-3-GLUCURONIDE	
	Incremento medio	Pazienti con incremento $\geq 1,5$ Range di incremento	Incremento medio	Pazienti con incremento $\geq 1,5$ Range di incremento	Incremento medio	Pazienti con incremento $\geq 1,5$ Range di incremento
IFN- γ	1,98	10/17 (58,8%) 1,5 – 8,2	3,94	8/15 (53,33%) 1,5 – 8,2	2,19	8/17 (47%) 1,5 - 7
TNF- α	2,54	11/17 (64,7%) 1,5 - 12	4,58	13/15 (86,6%) 1,5 – 24,2	2,9	11/17 (64,7%) 1,5 – 12,6
IFN- γ / TNF- α	1,9	9/17 (52,9%) 1,5 – 4,7	6,4	8/15 (53,33%) 1,5 – 38,4	3,28	9/17 (52,9%) 1,5 – 10,3

B	IDROSSITIROSOLO		IDROSSITIROSOLO-3-GLUCURONIDE		IDROSSITIROSOLO-4-GLUCURONIDE		IDROSSITIROSOLO-3-SOLFATO	
	Incr. medio	Pazienti con incr. $\geq 1,5$ Range di incremento	Incr. medio	Pazienti con incr. $\geq 1,5$ Range di incremento	Incr. medio	Pazienti con incr. $\geq 1,5$ Range di incremento	Incr. medio	Pazienti con incr. $\geq 1,5$ Range di incremento
IFN- γ	1,28	5/16 (31%) 1,5 – 3,5	2,5	9/16 (56,2%) 1,5 – 8,2	2,36	7/15 (46,6%) 1,5 – 8,4	2,42	6/12 (50%) 1,5 – 11,29
TNF- α	1,87	9/16 (56,2%) 1,5 – 4,6	2,67	10/16 (62,5%) 1,5 – 8,8	1,96	7/15 (46,6%) 1,5 – 6,08	3,84	8/12 (66,66%) 1,5 – 21,59
IFN- γ / TNF- α	1,67	6/16 (37,5%) 1,5 – 7,25	2,15	9/16 (56,2%) 1,5 – 25,8	3,21	9/15 (60%) 1,5 – 17,25	3,2	7/12 (58,3%) 1,5 – 12,53

Tabella 3. Dati relativi all'incremento della produzione di citochine antivirali indotto dal trattamento con i metaboliti di Resveratrolo e Oleuropeina.

Sono riportati i dati relativi alla produzione di IFN- γ , TNF- α ed entrambe le citochine contemporaneamente. La tabella A mostra i dati relativi al trattamento con i metaboliti del Reveratrolo; La tabella B quelli relativi al trattamento con i metaboliti dell'Oleuropeina. Per ogni metabolita indicato sono riportati i valori della media dell'incremento indotto nei vari pazienti testati, il numero di pazienti con incremento maggiore o pari a 1,5 e l'intervallo di incremento osservato nei pazienti analizzati.

In modo paragonabile a quanto osservato per i linfociti T CD8+, anche sulla popolazione totale di linfociti T CD3+ il trattamento con i metaboliti di Resveratrolo e Oleuropeina induce un significativo incremento nella produzione di citochine antivirali (IFN- γ and TNF- α) e nella frequenza di linfociti capaci di produrre entrambe le citochine. In particolare, si osserva un incremento medio paragonabile a quello ottenuto con Resveratrolo e Oleuropeina (**Figura 28**).

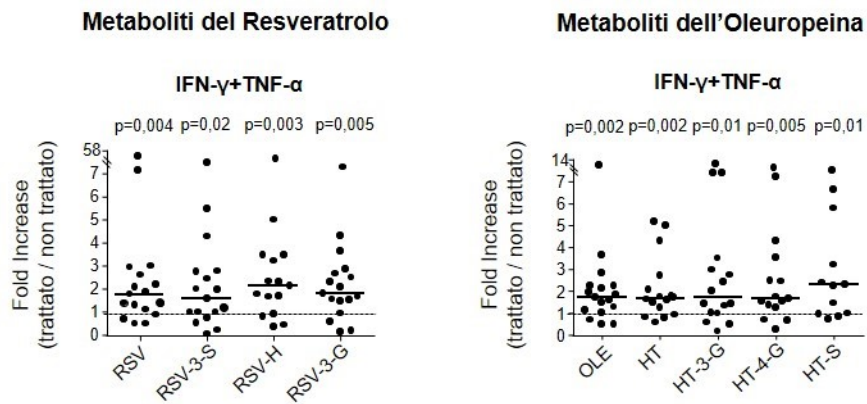


Figura 28. Recupero della risposta antivirale dell'intera popolazione di linfociti T CD3+ HBV-specifici di pazienti cronici in seguito al trattamento con i metaboliti di Resveratrolo (RSV) e Oleuropeina (OLE). I grafici riportano l'incremento (fold increase) nei livelli di linfociti T che producono sia IFN- γ che TNF- α , in seguito al trattamento con i metaboliti del Resveratrolo (a sinistra) e con i metaboliti dell'Oleuropeina (a destra), per ogni singolo paziente cronico considerato, dopo stimolazione con i peptidi della proteina core di HBV. Per ogni colonna è riportata la mediana corrispondente ai valori di fold increase. L'analisi statistica è stata effettuata applicando il test dei ranghi di Wilcoxon.

6. L'efficacia del trattamento con gli antiossidanti MitoQ e MitoTempo

aumenta se essi vengono associati ai composti polifenolici

Da uno studio precedentemente eseguito presso il laboratorio di Immunopatologia virale dell'Azienda Ospedaliero-universitaria di Parma è emerso che il trattamento con i composti ad azione antiossidante specifica per l'ambiente mitocondriale, MitoQ e MitoTempo, permette di ripristinare l'attività antivirale dei linfociti T HBV-specifici di pazienti con infezione cronica⁴⁶.

Con lo scopo di valutare se i composti polifenolici possano svolgere un'azione sinergica, in combinazione con MitoQ e MitoTempo, abbiamo coltivato *in vitro* le PBMCs di 13 pazienti con infezione cronica da HBV, in presenza di uno stimolo HBV-specifico e in presenza o assenza di combinazioni tra i vari composti considerati. Il decimo giorno è stata analizzata la produzione di citochine antivirali (IFN- γ , TNF- α , IL-2) e l'attività citotossica dei linfociti T CD8+ mediante l'analisi dell'espressione di CD107a.

Abbiamo valutato la percentuale di pazienti responsivi al trattamento considerato, intesa come percentuale di pazienti in cui il rapporto (fold increase) tra campione trattato e campione non trattato sia maggiore o uguale a 1,5.

Nonostante la percentuale di pazienti responsivi a MitoQ e a MitoTempo sia alta, l'associazione di tali composti con Resveratrolo o Oleuropeina incrementa la percentuale di risposta al trattamento, con un aumento variabile dal 10% al 30% a seconda della funzione considerata (**Figura 29A**). È importante notare che la percentuale di pazienti responsivi al trattamento raggiunge il 100% per quanto riguarda la produzione di IFN- γ nei campioni trattati con MitoTempo in associazione con Oleuropeina (**Figura 29A**).

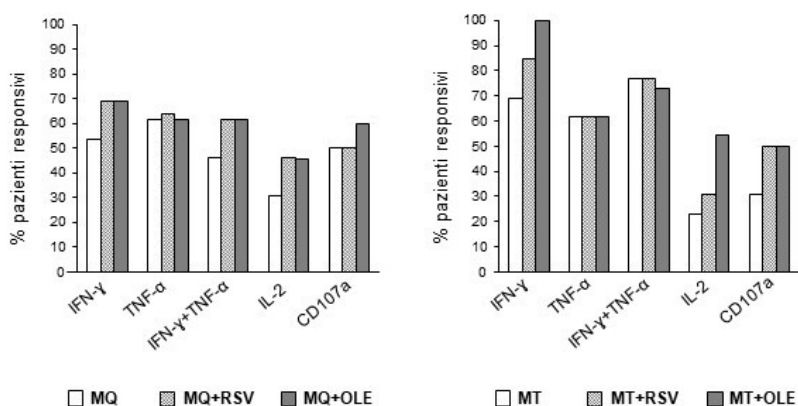
Abbiamo poi valutato il numero di funzioni recuperate rispetto a quelle analizzate, (produzione di IFN- γ , TNF- α , IL-2 e l'up-regolazione di CD107a), per ogni paziente testato, in

seguito al trattamento con i composti antiossidanti singolarmente o in associazione con Resveratrolo e Oleuropeina. Come è possibile osservare in **Figura 29B**, considerando il trattamento con MitoQ e MitoTempo singolarmente si ha una piccola percentuale di pazienti che non recuperano alcuna funzione (23,1% e 15,4%, rispettivamente); al contrario, se consideriamo i trattamenti con le associazioni degli antiossidanti con i composti polifenolici possiamo osservare che tutti i pazienti recuperano almeno una funzione (**Figura 29B**).

Inoltre, in seguito al trattamento con MitoQ in associazione a Resveratrolo e con MitoTempo in associazione a Oleuropeina, il 61,5% e il 77% dei pazienti testati, rispettivamente, recupera da 3 a 4 funzioni (**Figura 29B**).

Di conseguenza, il trattamento con l'associazione di MitoTempo e Oleuropeina sembra essere il più efficace nel recuperare un maggior numero di funzioni antivirali nei linfociti "*exhausted*" di pazienti con infezione cronica da HBV.

A



B

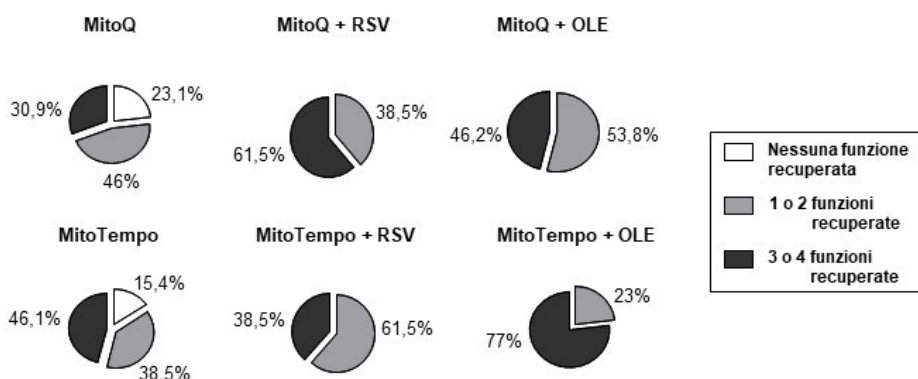


Figura 29. Analisi dell'efficacia del trattamento con le associazioni di MitoQ e MitoTempo con i composti polifenolici

Le PBMCs di 13 pazienti con infezione cronica da HBV sono state coltivate *in vitro* per 10 giorni in presenza o assenza di MitoQ o MitoTempo singolarmente oppure in combinazione con i composti polifenolici, Resveratrolo e Oleuropeina. Nel pannello A sono riportati i grafici relativi alla percentuale di pazienti responsivi al trattamento con MitoQ o MitoTempo singolarmente (barre bianche), in associazione con Resveratrolo (barre grigio chiaro) e in associazione con Oleuropeina (barre grigio scuro). E' stata considerata la produzione di IFN- γ , TNF- α , IL-2 e l'espressione di CD107a. I pazienti sono considerati responsivi al trattamento quando l'incremento della produzione di citochine o dell'espressione di CD107a, nel campione trattato rispetto a quello non trattato, è maggiore o uguale a 1,5. Nel pannello B i grafici mostrano la percentuale di pazienti che non recuperano alcuna funzione (in bianco), che recuperano 1 o 2 (in grigio) oppure 3 o 4 funzioni (in nero), in seguito al trattamento con i composti indicati.

E' stata valutata anche l'intensità della risposta promossa dal trattamento con le associazioni di MitoQ o MitoTempo con i composti polifenolici. In molti casi abbiamo osservato una maggiore intensità di risposta da parte dei linfociti T CD8+, intesa sia come produzione di citochine che come espressione di CD107a, nei campioni trattati con le associazioni di antiossidanti e composti polifenolici rispetto ai campioni trattati con MitoQ o MitoTempo singolarmente (**Figura 30**).

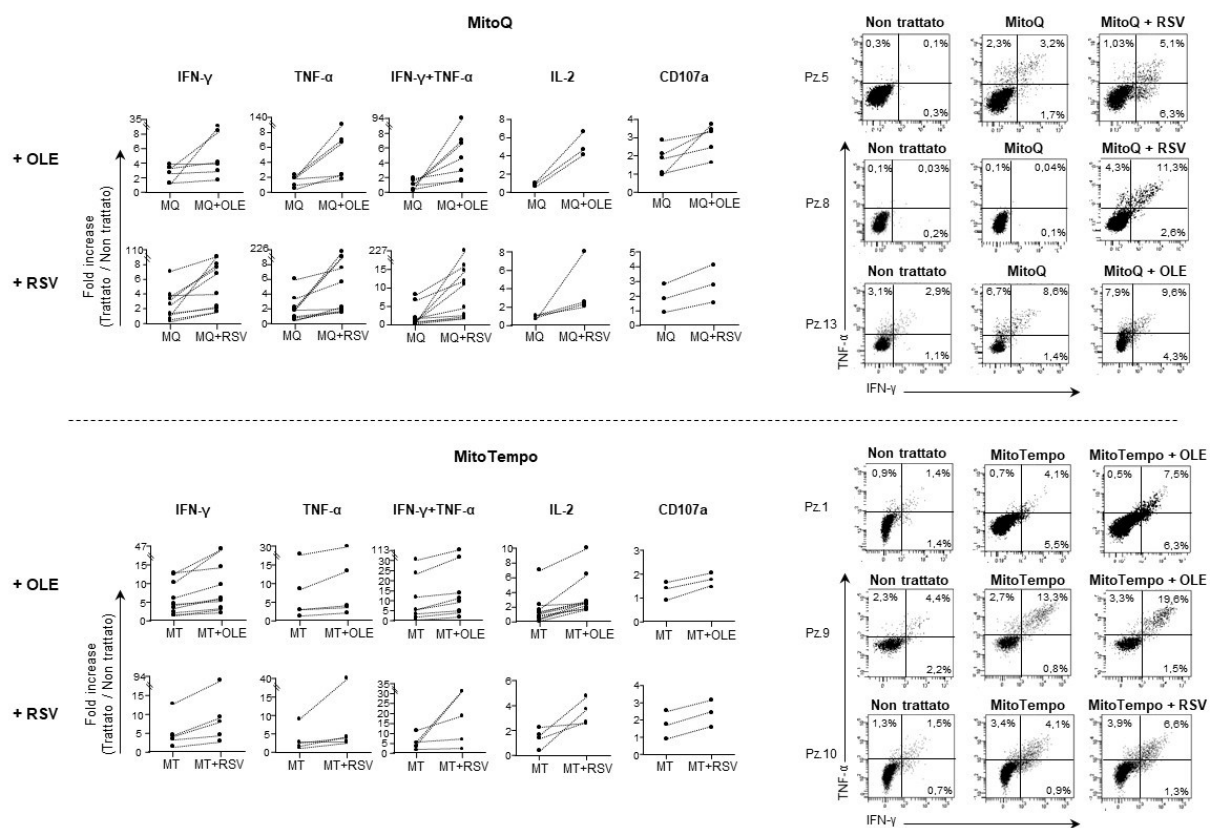


Figura 30. Intensità della risposta al trattamento con MitoQ o MitoTempo in associazione con i composti polifenolici, rilevata nei linfociti T CD8+

I grafici mostrano i valori di incremento nella produzione di citochine ed espressione di CD107a rilevati nel campione trattato rispetto al campione non trattato. I campioni trattati con le combinazioni di MitoQ (sopra) o MitoTempo (sotto) con Resveratrolo o Oleuropeina mostrano risposte più intense rispetto ai corrispondenti campioni trattati con gli antiossidanti singolarmente. Sulla destra sono riportati i dot-plot rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica relativa alla produzione di IFN-γ e TNF-α.

Data l'efficacia dei composti antiossidanti MitoQ e MitoTempo e dei polifenoli Resveratrolo e Oleuropeina nel ripristinare le funzioni antivirali dei linfociti T HBV-specifici "exhausted", è stato analizzato l'effetto dell'associazione di antiossidanti e polifenoli al trattamento con l'anticorpo anti-PD-L1. Si è osservato che tali associazioni aumentano l'efficacia del trattamento, in particolare l'aggiunta di MitoTempo o di Oleuropeina al trattamento con anti-PD-L1 si sono dimostrate le associazioni migliori, considerando l'incremento nella produzione di citochine e nell'espressione di CD107a rispetto al trattamento con il solo anticorpo anti-PD-L1 (Figura 31).

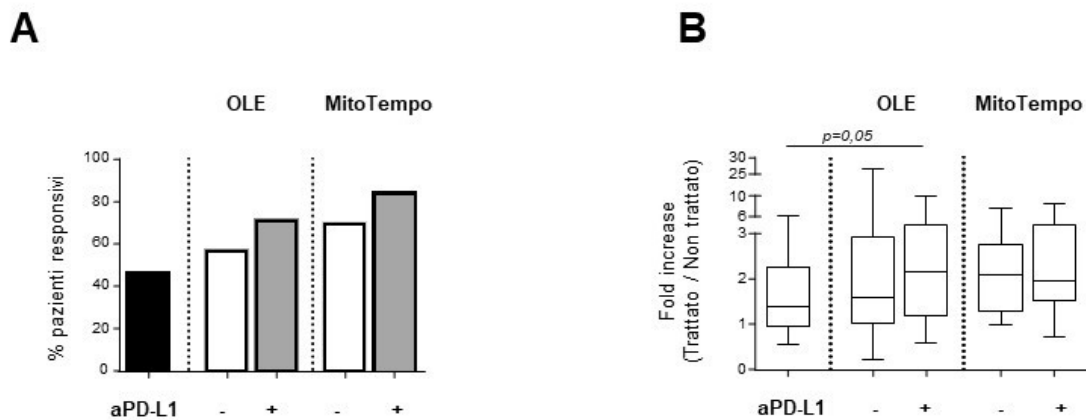


Figura 31. Effetto del trattamento con l'associazione di anti-PD-L1 con MitoTempo o Oleuropeina sulla produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T CD8+ HBV-specifici

A: Percentuale di pazienti responsivi al trattamento con anti-PD-L1 (barra nera, 20 pazienti testati), Oleuropeina (barra bianca, 20 pazienti testati), MitoTempo (barra bianca, 12 pazienti testati), anti-PD-L1 in associazione con Oleuropeina (barra grigia, 20 pazienti testati), anti-PD-L1 in associazione con MitoTempo (barra grigia, 12 pazienti testati). I pazienti sono considerati responsivi se, in seguito al trattamento, l'incremento nella produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T CD8+ è maggiore o uguale a 1,5 rispetto al corrispondente campione non trattato.

B: Il grafico mostra i valori di incremento nella produzione di IFN- γ nei linfociti T CD8+ in seguito al trattamento con i composti indicati, rispetto ai corrispondenti campioni non trattati. Sono riportati i valori della mediana di incremento. L'analisi statistica è stata effettuata applicando il test Wilcoxon per dati appaiati.

7. Specificità degli effetti del trattamento con le associazioni tra antiossidanti e composti polifenolici per i linfociti T HBV-specifici funzionalmente esauriti

Con l'obiettivo di determinare se l'efficacia del trattamento con le associazioni tra le sostanze antiossidanti e i composti polifenolici sia specifica per le cellule funzionalmente compromesse HBV-specifiche, sono stati valutati gli effetti di tali trattamenti su linfociti T con differente specificità. Infatti, se il trattamento con tali composti portasse ad una stimolazione aspecifica di tutta la popolazione T linfocitaria, potrebbe rappresentare una limitazione all'uso potenziale di questi trattamenti nella pratica clinica, a causa del possibile rischio di reazioni autoimmuni. È stato confrontato l'effetto del trattamento con MitoQ o MitoTempo in associazione con Resveratrolo o Oleuropeina, su cellule mononucleate isolate dal sangue periferico (PBMCs) di pazienti con infezione cronica da HBV coltivate *in vitro* per 10 giorni in presenza di uno stimolo con i peptidi corrispondenti alla proteina core di HBV e, parallelamente, in presenza di stimolazione con l'anticorpo anti-CD3. In questo modo è stato possibile confrontare l'effetto dei trattamenti su linfociti T CD8+ HBV-specifici "exhausted" e sull'intera popolazione T linfocitaria, valutando la produzione di citochine antivirali, IFN- γ e TNF- α (**Figura 32A**).

Analogamente è stato confrontato l'effetto degli stessi trattamenti su colture linfocitarie stimulate con i peptidi corrispondenti all'epitopo HLA-A2 ristretto della proteina core di HBV o della proteina della matrice del virus dell'influenza A (FLU), in modo tale da confrontare due popolazioni di linfociti T CD8+ con differente specificità (**Figura 32B**).

In **Figura 32** si osserva che in tutti i campioni che sono stati testati la produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T HBV-specifici in seguito al trattamento risulta maggiore rispetto a quella rilevata nelle colture di controllo.

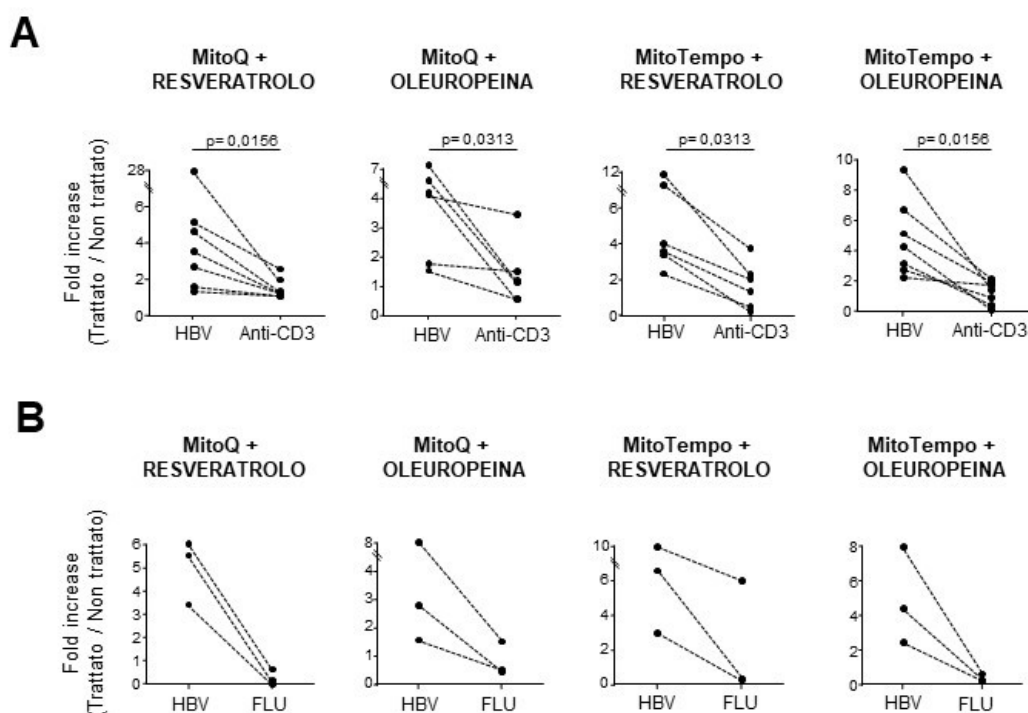


Figura 32. Effetto del trattamento con le associazioni di antiossidanti e polifenoli sulla produzione di IFN- γ da parte di linfociti T CD8+ con differenti specificità

I grafici riportati nel pannello A illustrano la variazione (fold increase) della produzione di IFN- γ in seguito a trattamento con le associazioni di MitoQ e MitoTempo con Resveratrol e Oleuropeina, in linee di linfociti T stimolati con peptidi HBV-specifici oppure stimolati con anti-CD3, negli stessi pazienti cronici.

L'analisi statistica è stata eseguita applicando il test di Wilcoxon per dati appaiati.

I grafici riportati nel pannello B mostrano la variazione (fold increase) della produzione di IFN- γ in seguito a trattamento con le associazioni di MitoQ e MitoTempo con Resveratrol e Oleuropeina, in linfociti T HBV-specifici e in linfociti T FLU-specifici degli stessi pazienti cronici HLA-A2+.

8. Effetto del trattamento con le associazioni tra antiossidanti e polifenoli su linfociti T CD8+ HBV-specifici con differenti specificità antigeniche

Studi riportati in letteratura, eseguiti su modelli murini⁸⁷ suggeriscono che i vari antigeni virali, prodotti ed espressi in quantità diverse dalle cellule infettate da HBV (ad esempio l'antigene *envelope* è prodotto in quantità 100 volte superiori rispetto all'antigene *polimerasi*)⁸⁸, possano indurre una differente risposta T linfocitaria; è stato infatti dimostrato che le quantità di antigeni virali sono responsabili della modulazione delle funzioni dei linfociti T in risposta all'infezione e presumibilmente anche del grado di esaurimento funzionale linfocitario⁸⁹.

Dal momento che tutti gli esperimenti svolti sono stati eseguiti su colture linfocitarie stimulate con peptidi della proteina *core* di HBV, abbiamo deciso di valutare se il trattamento con MitoTempo in associazione a Oleuropeina fosse efficace per linfociti specifici per epitopi appartenenti a diverse proteine di HBV. Sono state coltivate *in vitro* linee cellulari di linfociti T, generate in seguito a stimolazione delle PBMCs con miscele di peptidi corrispondenti alle proteine *core*, *envelope* e *polimerasi* di HBV, derivate da 9 pazienti affetti da epatite B cronica. Le cellule sono state incubate per 10 giorni, in presenza o in assenza di trattamento e, al decimo giorno, è stata valutata la produzione di IFN- γ e TNF- α attraverso marcatura intracellulare delle citochine (ICS) e successiva analisi tramite citometria a flusso. Come si osserva in **Figura 33**, il trattamento con MitoTempo in associazione a Oleuropeina promuove un incremento nella produzione di citochine antivirali da parte di linfociti T stimolati sia con peptidi della proteina *envelope* (ENV) che con quelli della *polimerasi* (POL), in modo analogo a quanto riscontrato in seguito a stimolazione con i peptidi della proteina *core* di HBV.

MitoTempo + Oleuropeina

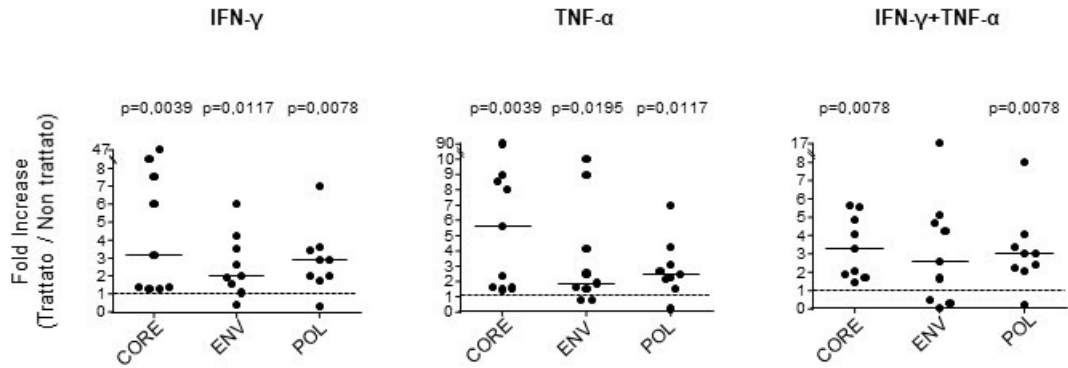


Figura 33. Effetto del trattamento con le associazioni di antiossidanti e polifenoli su linfociti T CD8+ HBV-specifici stimolati con differenti antigeni virali

I grafici mostrano l'incremento nella percentuale di cellule capaci di produrre IFN-γ, TNF-α, o entrambe le citochine contemporaneamente, in seguito al trattamento con MitoTempo in associazione a Oleuropeina e a stimolazione con peptidi delle proteine *core*, *envelope* (ENV) o *polimerasi* (POL) di HBV. Nei grafici è indicata la mediana di incremento. L'analisi statistica è stata eseguita applicando il test di Wilcoxon per ranghi.

DISCUSSIONE

In corso di epatite cronica da HBV le risposte T linfocitarie risultano funzionalmente compromesse, e tale difetto funzionale contribuisce alla persistenza del virus all'interno dell'organismo ospite²⁵. Le terapie utilizzate per il trattamento dell'epatite B cronica sono rivolte principalmente ad ottenere la soppressione a lungo termine della replicazione virale e raramente permettono di ottenere la completa eradicazione del virus. Inoltre, la somministrazione di analoghi nucleos(t)idici (NUC), che attualmente rappresenta la principale terapia per l'infezione da HBV, nella maggior parte dei pazienti deve essere proseguita per tutta la vita a causa del rischio di pericolose riattivazioni virali in conseguenza alla sospensione del trattamento⁹⁰. Esiste pertanto la necessità urgente di individuare nuove strategie terapeutiche che siano rivolte ad implementare la risposta immunitaria in corso di infezione da HBV, in modo tale da accelerare il controllo virale completo. Una strategia potenziale, utilizzata con successo in ambito oncologico, è rappresentata dal blocco del legame inibitorio tra PD-1 e PD-L1⁹¹. Tale strategia è risultata solo parzialmente efficace nel modello di epatite B cronica *in vitro*⁹², inoltre la somministrazione *in vivo* dell'anticorpo anti-PD-1 ha promosso soltanto un debole recupero delle funzioni linfocitarie antivirali ed un limitato declino della concentrazione di HBsAg⁹³. Una strategia alternativa è rappresentata dalla correzione delle funzioni metaboliche e intracellulari che sono alterate nei linfociti T CD8+ "exhausted" dei pazienti con infezione cronica da HBV, promuovendo così la formazione di una popolazione linfocitaria funzionalmente efficiente e protettiva. Con l'obiettivo di individuare le principali funzioni intracellulari alterate nei linfociti HBV-specifici di pazienti con infezione cronica, è stata precedentemente eseguita un'analisi trascrittomica di tali cellule, a confronto con linfociti virus-specifici funzionalmente efficienti di pazienti

guariti spontaneamente da un'infezione acuta e soggetti sani⁴⁶. Tale analisi ha evidenziato una marcata down-regolazione genica di numerosi *pathways* intracellulari, nei linfociti "exhausted", tra i quali sono risultati maggiormente significativi i processi relativi all'attività mitocondriale e del proteasoma. Esperimenti funzionali hanno permesso di evidenziare la presenza di elevati livelli di mitocondri depolarizzati, con accumulo di ROS e anche di aggregati proteici intracellulari, suggerendo che la correzione di tali processi disfunzionali potrebbe essere una strategia utile al ripristino delle funzioni linfocitarie antivirali. Lo studio oggetto della presente tesi ha permesso di indagare ulteriormente i processi di proteostasi intracellulare, individuando un'alterazione a livello del flusso autofagico dei linfociti T CD8+ HBV-specifici di pazienti con infezione cronica. E' noto che il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) e l'autofagia mediata dai lisosomi rappresentano componenti della proteostasi cellulare distinti ma strettamente interconnessi⁹⁴. Il sistema ubiquitina-proteasoma è composto da complessi enzimatici multicatalitici adibiti allo smaltimento di complessi proteici danneggiati⁹⁴, rivestendo un ruolo di grande importanza nel controllo della qualità delle proteine. Infatti, proteine mal ripiegate o danneggiate possono dare origine ad aggregati proteici potenzialmente dannosi e "citotossici"⁹⁵. L'autofagia è un processo di degradazione mediato dai lisosomi, coinvolto nel *turnover* degli organelli citoplasmatici e nella degradazione degli aggregati proteici⁹⁵.

Quando il sistema ubiquitina-proteasoma è inibito, il flusso autofagico risulta up-regolato, agendo come *pathway* alternativo per il processo di degradazione proteica. La compromissione del processo autofagico, al contrario, può portare ad una maggiore attività del proteasoma oppure ad un'alterazione dell'attività del proteasoma con conseguente accumulo di aggregati proteici intracellulari che non vengono smaltiti⁹⁴. Quando nell'ambiente intracellulare si ha un eccesso di specie reattive dell'ossigeno (ROS), prodotte

in seguito ad una disfunzione mitocondriale, il sistema ubiquitina-proteasoma e il processo autofagico possono bloccarsi a causa di un eccessivo accumulo di prodotti da smaltire, portando in tal modo ad un ridotto turnover proteico e degli organelli intracellulari; questa condizione può diventare deleteria per la cellula e può portare alla morte cellulare^{56,96,97}. La condizione di alterazione della proteostasi cellulare associata alla funzione mitocondriale non è soltanto conseguenza diretta del danno ossidativo sull'attività del proteasoma^{55,56}, ma è anche causata da un contributo insufficiente del mitocondrio alla degradazione delle proteine "misfolded".⁹⁸ Infatti, è stato recentemente descritto il coinvolgimento del mitocondrio nello smantellamento degli aggregati proteici citosolici mediante un meccanismo di importazione attiva delle proteine nella matrice mitocondriale, dove vengono disassemblate da parte delle proteasi mitocondriali^{99,100}. Un ulteriore meccanismo che evidenzia la centralità del mitocondrio nella proteostasi cellulare è stato evidenziato in un altro studio che mostra come un'alterazione nella catena respiratoria mitocondriale può inibire la capacità di idrolisi lisosomiale, inibendo pertanto l'autofagia, attraverso la repressione della segnalazione di AMPK¹⁰¹. Date queste evidenze è possibile parlare di un vero e proprio *interplay* tra mitocondrio e proteostasi cellulare, dove il sistema ubiquitina-proteasoma e l'autofagia giocano un ruolo attivo nel mantenimento dell'omeostasi mitocondriale, nella mitofagia e nel turnover degli organelli intracellulari⁵⁵. È importante considerare che disfunzioni mitocondriali e dei meccanismi di proteostasi intracellulare sono caratteristiche comuni del processo di invecchiamento cellulare e dei disordini legati alla senescenza cellulare, che si osservano nelle patologie neurodegenerative. In modelli animali di Alzheimer si è osservato che, incrementando l'attività mitocondriale correlata alla proteostasi, si riduceva l'accumulo di aggregati proteici e veniva, inoltre, ritardato il progredire della patologia^{102,103}. L'interconnessione tra mitocondrio e proteostasi cellulare è

stata studiata anche nei linfociti T, dove si è osservato che l'inibizione del proteasoma provoca la depolarizzazione della membrana mitocondriale e la traslocazione di proteine mitocondriali pro-apoptotiche nel citoplasma con conseguente induzione di apoptosi⁵⁷. Un altro aspetto che conferma la presenza di un'interconnessione tra funzioni mitocondriali e proteostasi cellulare è stato confermato da uno studio in cui si è osservato che linfociti T difettivi del fattore di trascrizione mitocondriale TFAM mostrano un flusso autofagico alterato¹⁰⁴. Inoltre, l'esposizione dei linfociti T allo stress ossidativo può ridurre l'attività catalitica del proteasoma, causando una ridotta responsività linfocitaria con sviluppo di caratteristiche tipiche del processo di senescenza cellulare¹⁰⁵.

L'obiettivo di questo studio è quello di ricercare e studiare dei composti biologicamente attivi che possano agire sia sulla funzionalità mitocondriale che sulla proteostasi cellulare in modo tale da ripristinare le funzioni antivirali dei linfociti T "*exhausted*". Ci siamo chiesti se i composti polifenolici, Resveratrolo e Oleuropeina, possano ripristinare le funzioni alterate riscontrate nei linfociti T HBV-specifici di pazienti con infezione cronica e, inoltre, se possano incrementare l'efficacia del trattamento con i composti antiossidanti specifici per il mitocondrio MitoQ e MitoTempo⁴⁶.

Molti composti polifenolici di origine naturale sono noti per la loro attività antiossidante e vi è un crescente numero di evidenze che riportano il loro effetto positivo sulla funzionalità mitocondriale e sulla proteostasi cellulare^{60,61,106}. Sia Oleuropeina che Resveratrolo sono stati descritti come molecole capaci di sostenere la funzionalità mitocondriale e il turnover delle proteine attraverso meccanismi diretti ed indiretti e mediante l'attivazione di diverse vie di segnalazione^{62,107}. Entrambi questi composti polifenolici di origine naturale sembrano promuovere la fosforilazione di AMPK, con conseguente up-regolazione delle sirtuine e induzione delle risposte antiossidanti Nrf2-dipendenti, generando un effetto positivo sulle

cellule sottoposte a stress ossidativo^{62,64-66,108-110}. In particolare, il *pathway* di Nrf2 ha funzione citoprotettiva e rappresenta uno dei principali regolatori dell'omeostasi cellulare attraverso la regolazione della funzione mitocondriale a diversi livelli e il controllo dell'espressione di geni coinvolti nel mantenimento della fisiologia del reticolo endoplasmatico, dell'attività del proteasoma e dell'autofagia¹¹¹.

Sulla base di queste evidenze, abbiamo testato l'efficacia di Oleuropeina e Resveratrolo nel ripristinare le funzioni mitocondriali e la proteostasi cellulare dei linfociti T virus-specifici di pazienti con infezione cronica da HBV, cercando in questo modo di recuperare la loro funzione antivirale. Entrambi i composti polifenolici sono in grado di ridurre in modo significativo la percentuale di linfociti T CD8+ con mitocondri depolarizzati, i livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nell'ambiente intracellulare e l'accumulo di proteine non smaltite (aggresomi), inducendo di conseguenza un incremento della produzione di citochine antivirali da parte dei linfociti T HBV-specifici. Tali risultati rendono i composti polifenolici candidati potenziali nella prospettiva di una possibile traslazione *in vivo*. Una maggiore limitazione, nei confronti di una possibile traslazione ~~in~~ alla clinica, è rappresentata dalla loro bassa biodisponibilità e dal rapido metabolismo che tali composti subiscono *in vivo*^{69,112}. Questa problematica è stata ampiamente affrontata in diversi studi, nei quali, allo scopo di rendere i composti polifenolici maggiormente biodisponibili, sono state testate formulazioni differenti, modalità alternative di somministrazione, ed il possibile utilizzo di "*bio-enhancer*"^{77,112-115}.

Per affrontare il problema della limitata biodisponibilità di Oleuropeina e Resveratrolo, abbiamo analizzato gli effetti di alcuni dei principali metaboliti dei composti polifenolici, i quali vengono generati *in vivo* in seguito alla somministrazione dei polifenoli stessi. Tali metaboliti includono le forme glucuronide e solfato di Resveratrolo e di idrossi-tirosolo, che

rappresenta la prima molecola generata *in vivo* in seguito all'idrolisi dell'Oleuropeina^{70,76,77}. Tali molecole sono state riscontrate nel sangue e nelle urine, in seguito all'assunzione di Oleuropeina e Resveratrolo, in concentrazioni nettamente superiori rispetto alle molecole iniziali^{77,116}.

Tutti i metaboliti testati hanno permesso di osservare un incremento nella produzione di citochine antivirali a livelli comparabili o addirittura superiori rispetto a quelli indotti da Oleuropeina e Resveratrolo. Tra i metaboliti testati, la forma 3'-glucuronide del Resveratrolo è quella che ha indotto l'incremento più significativo in termini di percentuale di linfociti T CD8+ capaci di produrre sia IFN- γ che TNF- α . I dati ottenuti, sono in linea con quelli riportati in uno studio precedente, in cui le proprietà antiossidanti dell'idrossitirosolo glucuronide risultavano maggiori rispetto a quelle osservate testando il composto originale¹¹⁷.

Data la potenziale complementarità dei composti antiossidanti attivi a livello mitocondriale e i composti polifenolici, ci siamo chiesti se la loro associazione potrebbe aumentare l'efficacia di tali composti nel ripristinare le funzioni antivirali dei linfociti T.

E' stato recentemente riportato che il trattamento con MitoQ in colture cellulari, in cui era stata indotta all'inibizione del proteasoma, con conseguente ossidazione a livello citosolico, è capace di limitare la produzione di ROS mitocondriali ma non è in grado di correggere lo stato di ossidazione a livello citosolico, inducendo soltanto un parziale recupero della vitalità cellulare, la quale risulta essere maggiormente recuperata in seguito al trattamento con Resveratrolo¹¹⁸. In linea con questi dati, il trattamento combinato effettuato con i composti antiossidanti attivi a livello mitocondriale e i composti polifenolici ha causato un aumento nella percentuale di risposte al trattamento stesso, in termini di produzione di citochine e incremento della polifunzionalità. L'efficacia maggiore, tra i vari trattamenti combinati che abbiamo testato, è stata osservata con l'associazione di MitoTempo e Oleuropeina. Tali

composti sono risultati più efficaci rispetto alla strategia di blocco del legame inibitorio PD1/PDL1, nell'incrementare le funzioni antivirali dei linfociti T CD8+ HBV-specifici.

Recentemente è stato dimostrato che, durante l'infezione cronica da HBV, i linfociti T virus-specifici esprimono caratteristiche funzionali e fenotipiche differenti a seconda dell'epitopo virale riconosciuto. Sono stati evidenziati infatti differenti livelli di disfunzione linfocitaria a seconda della specificità antigenica dei linfociti T^{87,119,120}. Le differenti quantità di antigeni dell'*envelope*, del *core* e della *polimerasi* espressi negli epatociti infettati da HBV potrebbe spiegare tale fenomeno almeno in parte, in quanto ci sono evidenze che la quantità di antigene presente negli epatociti infettati possa modulare le funzioni dei linfociti T virus-specifici^{88,89}.

Tuttavia, studi eseguiti nei modelli animali di infezione cronica hanno dimostrato la possibile coesistenza di differenti sottopopolazioni di linfociti T funzionalmente esauriti nell'ospite infetto, caratterizzati dalla differente espressione di marcatori di *exhaustion* e di memoria, e dotati di differente sensibilità al ripristino funzionale¹²¹⁻¹²³.

Pertanto, abbiamo considerato importante verificare l'effetto del trattamento con gli antiossidanti ad azione mitocondriale in associazione con i composti polifenolici per linfociti T con differente specificità antigenica. I nostri risultati indicano che l'efficacia del trattamento per linfociti T CD8+ specifici per *core*, *envelope* e *polimerasi* è confrontabile, indipendentemente dal grado di *exhaustion* linfocitaria. Questi dati differiscono rispetto a quelli precedentemente osservati negli esperimenti di blocco del legame PD1/PD-L1, dove il ripristino funzionale della risposta antivirale dei linfociti T HBV-specifici utilizzando gli anticorpi anti-PD-L1 si è ottenuto principalmente per i linfociti *core*- e *polimerasi*-specifici e, al contrario, non si è osservato per quelli *envelope*-specifici³⁸.

Una possibile limitazione alle terapie immunomodulanti, che hanno come obiettivo quello di incrementare le funzioni antivirali dei linfociti T, è la potenziale insorgenza di patologie autoimmuni a causa di una stimolazione indiscriminata delle popolazioni di linfociti T funzionalmente efficienti con differenti specificità antigeniche. Con l'obiettivo di verificare se l'effetto di questi composti sia specifico per i linfociti T *exhausted*, abbiamo confrontato linee cellulari di linfociti T stimulate con peptidi HBV-specifici oppure con antigeni virali differenti, come peptidi influenza-specifici, oppure con gli anticorpi anti-CD3 e anti-CD28, capaci di stimolare l'intera popolazione di linfociti T. I dati ottenuti hanno indicato un incremento significativo nella produzione di citochine antivirali, in seguito al trattamento, sulle linee cellulari stimulate con peptidi HBV-specifici, rispetto alle corrispondenti colture cellulari di controllo. Questo risultato suggerisce che vi sia un effetto preferenziale dei trattamenti testati sui linfociti T *exhausted*, limitando così la possibile insorgenza di reazioni di autoimmunità indesiderate.

Concludendo, tale studio ha confermato che durante l'infezione cronica da HBV i meccanismi di proteostasi cellulare sono disfunzionali; lo studio di tali processi è stato necessariamente parziale, poiché la bassa frequenza di linfociti T CD8+ virus-specifici riscontrabile nel sangue periferico di pazienti con infezione cronica da HBV non ha permesso di utilizzare tecnologie differenti rispetto alla citofluorimetria. Abbiamo osservato che, ripristinando le funzioni mitocondriali e i processi di proteostasi, si ottiene un significativo incremento della funzione antivirale dei linfociti T CD8+, il quale risulta essere maggiore rispetto a quello indotto dal blocco del legame inibitorio PD1/PD-L1. L'effetto dei trattamenti testati è risultato minore per linfociti T con differente specificità antigenica, funzionalmente efficienti. Inoltre, i trattamenti testati sono risultati efficaci nel ripristinare le funzioni antivirali di linfociti T CD8 HBV-specifici con differenti specificità antigeniche (*core, envelope e polimerasi*),

caratterizzati da differenti livelli di esaurimento funzionale. Il trattamento combinato attraverso l'associazione di antiossidanti specifici per l'ambiente mitocondriale e composti polifenolici di origine naturale ha permesso di modulare simultaneamente differenti processi intracellulari che sono risultati alterati nei linfociti *"exhausted"* di pazienti con infezione cronica da HBV; ciò rappresenta una strategia potenziale nella prospettiva di ideare delle terapie immunomodulanti per l'epatite cronica da HBV.

BIBLIOGRAFIA

1. Bruss, V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.* **13**, 65 (2007).
2. Seeger, C. & Mason, W. S. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 51–68 (2000).
3. Seeger, C. & Mason, W. S. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology* **479–480**, 672–86 (2015).
4. Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* **1**, (2012).
5. Sunbul, M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J. Gastroenterol.* **20**, 5427 (2014).
6. Huy, T. T. T., Ngoc, T. T. & Abe, K. New Complex Recombinant Genotype of Hepatitis B Virus Identified in Vietnam. *J. Virol.* **82**, 5657–5663 (2008).
7. Tatematsu, K. *et al.* A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J. Virol.* **83**, 10538–10547 (2009).
8. MacLachlan, J. H. & Cowie, B. C. Hepatitis B virus epidemiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, 1–12 (2015).
9. Hwang W, E. & Cheung Ramsey. Global Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) Infection | NAJMS: The North American Journal of Medicine and Science. *North Am. J. Med. Sci.* **4**, 7-13 (2011).
10. Lai, A. *et al.* What is changed in HBV molecular epidemiology in Italy? *J. Med. Virol.* **90**, 786–795 (2018).
11. Lampertico, P. *et al.* EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **67**, 370–398 (2017).
12. Kennedy, P. T. F. *et al.* Preserved T-Cell Function in Children and Young Adults With Immune-Tolerant Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* **143**, 637–645 (2012).
13. Yuen, M.-F. & Lai, C.-L. Natural history of chronic hepatitis B virus infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, E20–E24 (2000).
14. Zoulim, F., Lebossé, F. & Levrero, M. Current treatments for chronic hepatitis B virus infections. *Curr. Opin. Virol.* **18**, 109–116 (2016).
15. Viganò, M., Grossi, G., Loglio, A. & Lampertico, P. Treatment of hepatitis B: Is there still a role for interferon? *Liver International.* **38**, 79-83 (2018).
16. Levrero, M., Subic, M., Villeret, F. & Zoulim, F. Perspectives and limitations for nucleo(t)side analogs in future HBV therapies. *Current Opinion in Virology.* **30**, 80-89 (2018).

17. Craxì, A., Antonucci, G., Cammà, C. Treatment options in HBV. *Journal of Hepatology*. **44**, 77-83 (2006).
18. Grossi, G., Viganò, M., Loglio, A. & Lampertico, P. Hepatitis B virus long-term impact of antiviral therapy nucleot(s)ide analogues (NUCs). *Liver International*. **37**, 45-51 (2017).
19. Shih, C. *et al.* Control and Eradication Strategies of Hepatitis B Virus. *Trends in Microbiology*. **24**, 739-749 (2016).
20. Petersen, J., Thompson, A. J. & Levrero, M. Aiming for cure in HBV and HDV infection. *Journal of Hepatology*. **65**, 835-848 (2016).
21. Kapoor, R. & Kottlilil, S. Strategies to eliminate HBV infection. *Future Virol*. **9**, 565–585 (2014).
22. Wang, X. Y. & Chen, H. S. Emerging antivirals for the treatment of hepatitis B. *World J. Gastroenterol*. **20**, 7707–7717 (2014).
23. Guidotti, L. G. & Chisari, F. V. IMMUNOBIOLOGY AND PATHOGENESIS OF VIRAL HEPATITIS. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. **1**, 23–61 (2006).
24. Bertoletti, A. & Ferrari, C. Republished: Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Postgrad. Med. J*. **89**, 294–304 (2013).
25. Ferrari, C. HBV and the immune response. *Liver Int*. **35**, 121–128 (2015).
26. Balmasova, I. P. *et al.* Immunopathogenesis of chronic hepatitis B. *World J. Gastroenterol*. **20**, 14156-14171 (2014).
27. Rehermann, B. & Nascimbeni, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* **5**, 215–229 (2005).
28. Bertoletti, A. & Ferrari, C. Adaptive immunity in HBV infection. *Journal of Hepatology*. **64**, S71-S83 (2016).
29. Ahmed Said, Z. N. & Abdelwahab, K. S. Induced immunity against hepatitis B virus. *World J. Hepatol*. **7**, 1660–1670 (2015).
30. Wang, L. Crosstalk between innate and adaptive immunity in hepatitis B virus infection. *World J. Hepatol*. **7**, 2980 (2015).
31. Shimizu, Y. T cell immunopathogenesis and immunotherapeutic strategies for chronic hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol*. **18**, 2443–2451 (2012).
32. Rapicetta, M., Ferrari, C. & Levrero, M. Viral determinants and host immune responses in the pathogenesis of HBV infection. *J. Med. Virol*. **67**, 454–457 (2002).
33. Wherry, E. J. & Ahmed, R. Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. *J. Virol*. **78**, 5535–5545 (2004).
34. Bertoletti, A. & Ferrari, C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology* **38**, 4–13 (2003).
35. McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S. & Wherry, E. J. CD8 T Cell Exhaustion During

- Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 457–495 (2019).
36. Zajac, a J. *et al.* Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* **188**, 2205–2213 (1998).
 37. Pauken, K. E. & Wherry, E. J. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* **36**, 265–276 (2015).
 38. Boni, C. *et al.* Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection. *J. Virol.* **81**, 4215–4225 (2007).
 39. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 486–499 (2015).
 40. Kahan, S. M., Wherry, E. J. & Zajac, A. J. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology* **479–480**, 180–193 (2015).
 41. Bengsch, B., Martin, B. & Thimme, R. Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation. *J. Hepatol.* **61**, 1212–1219 (2014).
 42. Fisicaro, P. *et al.* Combined Blockade of Programmed Death-1 and Activation of CD137 Increase Responses of Human Liver T Cells Against HBV, But Not HCV. *Gastroenterology* **143**, 1576–1585.e4 (2012).
 43. Nebbia, G. *et al.* Upregulation of the Tim-3/Galectin-9 Pathway of T Cell Exhaustion in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *PLoS One* **7**, e47648 (2012).
 44. Raziorrouh, B. *et al.* The immunoregulatory role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus-specific CD8+ T-cell function. *Hepatology* **52**, 1934–1947 (2010).
 45. Schurich, A. *et al.* Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-Prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection. *Hepatology* **53**, 1494–1503 (2011).
 46. Fisicaro, P. *et al.* Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of exhausted HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. *Nat. Med.* **23**, 327–336 (2017).
 47. Weinberg, S. E., Sena, L. A. & Chandel, N. S. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity.* **42**, 406-417 (2015).
 48. Goldberg, A. L. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 12–17 (2007).
 49. Groettrup, M., Kirk, C. J. & Basler, M. Proteasomes in immune cells: More than peptide producers? *Nature Reviews Immunology.* **10**, 73-78 (2010).
 50. Sperka, T., Wang, J. & Rudolph, K. L. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 579–590 (2012).
 51. Smith, R. A. J. & Murphy, M. P. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1201**, 96–103 (2010).

52. Murphy, M. P. Targeting Antioxidants to Mitochondria by Conjugation to Lipophilic Cations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **47**, 629-56 (2007).
53. Widjaja, C. E. *et al.* Proteasome activity regulates CD8+ T lymphocyte metabolism and fate specification. *Journal of Clinical Investigation.* **127**, 3609-3623 (2017).
54. Bragoszewski, P., Turek, M. & Chacinska, A. Control of mitochondrial biogenesis and function by the ubiquitin–proteasome system. *Open Biol.* **7**, 170007 (2017).
55. Gumeni, S. & Trougakos, I. P. Cross Talk of Proteostasis and Mitostasis in Cellular Homeodynamics, Ageing, and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–24 (2016).
56. Lefaki, M., Papaevgeniou, N. & Chondrogianni, N. Redox regulation of proteasome function. *Redox Biol.* **13**, 452–458 (2017).
57. Berges, C. *et al.* Proteasome inhibition activates the mitochondrial pathway of apoptosis in human CD4+ T cells. *J. Cell. Biochem.* **108**, 935-946 (2009).
58. Das, R., Ponnappan, S. & Ponnappan, U. Redox regulation of the proteasome in T lymphocytes during aging. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 541-551 (2007).
59. Dhouafli, Z. *et al.* Inhibition of protein misfolding and aggregation by natural phenolic compounds. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**, 3521-3538 (2018).
60. Umeno, A., Horie, M., Murotomi, K., Nakajima, Y. & Yoshida, Y. Antioxidative and Antidiabetic Effects of Natural Polyphenols and Isoflavones. *Molecules* **21**, 708 (2016).
61. Wedel, S., Manola, M., Cavinato, M., Trougakos, I. & Jansen-Dürr, P. Targeting Protein Quality Control Mechanisms by Natural Products to Promote Healthy Ageing. *Molecules* **23**, 1219 (2018).
62. de Oliveira, M. R. *et al.* Resveratrol and the mitochondria: From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1860**, 727–745 (2016).
63. Rigacci, S. *et al.* Oleuropein aglycone induces autophagy *via* the AMPK/mTOR signalling pathway: a mechanistic insight. *Oncotarget* **6**, (2015).
64. Price, N. L. *et al.* SIRT1 Is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function. *Cell Metab.* **15**, 675–690 (2012).
65. Menendez, J. A. *et al.* Xenohormetic and anti-aging activity of secoiridoid polyphenols present in extra virgin olive oil: A new family of gerosuppressant agents. *Cell Cycle* **12**, 555-578 (2013).
66. Giovannelli, L. Beneficial effects of olive oil phenols on the aging process: Experimental evidence and possible mechanisms of action. *Nutr. Aging* **1**, 207-223 (2012).
67. Ajami, M. *et al.* Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease and their modulation by polyphenols. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **73**, 39–47 (2017).
68. Martínez-Huélamo, M., Rodríguez-Morató, J., Boronat, A. & de la Torre, R. Modulation of Nrf2 by Olive Oil and Wine Polyphenols and Neuroprotection. *Antioxidants* **6**, 73 (2017).

69. Walle, T. Bioavailability of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1215**, 9-15 (2011).
70. Nunes, S., Danesi, F., Del Rio, D. & Silva, P. Resveratrol and inflammatory bowel disease: the evidence so far. *Nutr. Res. Rev.* **31**, 85–97 (2018).
71. Whitaker, R. M., Corum, D., Beeson, C. C. & Schnellmann, R. G. Mitochondrial Biogenesis as a Pharmacological Target: A New Approach to Acute and Chronic Diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **56**, 229-249 (2016).
72. Camins, A. *et al.* Resveratrol: An Antiaging Drug with Potential Therapeutic Applications in Treating Diseases. *Pharmaceuticals* **2**, 194-205 (2009).
73. Smoliga, J. M., Baur, J. A. & Hausenblas, H. A. Resveratrol and health - A comprehensive review of human clinical trials. *Molecular Nutrition and Food Research* **55**, 1129-1141 (2011).
74. Covas, M. I. *et al.* Minor components of olive oil: Evidence to date of health benefits in humans. *Nutrition Reviews* **64**, 20-30 (2006).
75. Bovicelli, P. Radical-scavenging polyphenols: new strategies for their synthesis. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**, 1703-1710 (2007).
76. Vissers, M. N., Zock, P. L., Roodenburg, A. J. C., Leenen, R. & Katan, M. B. Olive Oil Phenols Are Absorbed in Humans. *J. Nutr.* **132**, 409–417 (2002).
77. de Bock, M. *et al.* Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (*Olea europaea* L.) leaf extract. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 2079–2085 (2013).
78. Sun, W. *et al.* Oleuropein improves mitochondrial function to attenuate oxidative stress by activating the Nrf2 pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats. *Neuropharmacology* **113**, 556-566 (2017).
79. Katsiki, M., Chondrogianni, N., Chinou, I., Rivett, A. J. & Gonos, E. S. The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res.* **10**, 157-172 (2007).
80. Batard, P. *et al.* Dextramers: New generation of fluorescent MHC class I/peptide multimers for visualization of antigen-specific CD8+ T cells. *J. Immunol. Methods* **310**, 136–148 (2006).
81. Warnes, G. Flow cytometric assays for the study of autophagy. *Methods* **82**, 21–28 (2015).
82. Mauthe, M. *et al.* Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **14**, 1435–1455 (2018).
83. Chan, L. L.-Y. *et al.* A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. *Autophagy* **8**, 1371–1382 (2012).
84. Troiano, L. *et al.* Multiparametric analysis of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis by polychromatic flow cytometry. *Nat. Protoc.* **2**, 2719-2727 (2007).

85. Warnes, G. Flow cytometric assays for the study of autophagy. *Methods* **82**, 21-28 (2015).
86. Harari, A. *et al.* Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol. Rev.* **211**, 236–254 (2006).
87. Kakimi, K., Isogawa, M., Chung, J., Sette, A. & Chisari, F. V. Immunogenicity and Tolerogenicity of Hepatitis B Virus Structural and Nonstructural Proteins: Implications for Immunotherapy of Persistent Viral Infections. *J. Virol.* **76**, 8609-8620 (2002).
88. Hirsch, R. C., Lavine, J. E., Chang, L. J., Varmus, H. E. & Ganem, D. Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature* **344**, 552-555 (1990).
89. Gehring, A. J. *et al.* The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function. *J. Virol.* **81**, 2940-2949 (2007).
90. Lau, D. T.-Y. & Bleibel, W. Current status of antiviral therapy for hepatitis B. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **1**, 61–75 (2008).
91. Darvin, P., Toor, S. M., Sasidharan Nair, V. & Elkord, E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp. Mol. Med.* **50**, 1–11 (2018).
92. Fiscaro, P., Boni, C., Barili, V., Laccabue, D. & Ferrari, C. Strategies to overcome HBV-specific T cell exhaustion: checkpoint inhibitors and metabolic re-programming. *Curr. Opin. Virol.* **30**, 1–8 (2018).
93. Gane, E. *et al.* Anti-PD-1 blockade with nivolumab with and without therapeutic vaccination for virally suppressed chronic hepatitis B: A pilot study. *J. Hepatol.* **71**, 900–907 (2019).
94. Kocaturk, N. M. & Gozuacik, D. Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, 128 (2018).
95. Olzmann, J. A., Li, L. & Chin, L. S. Aggresome Formation and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications. *Curr. Med. Chem.* **15**, 47-60 (2008).
96. Avery, S. V. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem. J.* **434**, 201–210 (2011).
97. Korovila, I. *et al.* Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox Biol.* **13**, 550–567 (2017).
98. Sorrentino, V. *et al.* Enhancing mitochondrial proteostasis reduces amyloid- β proteotoxicity. *Nature* **552**, 187-193 (2017).
99. D’Amico, D., Sorrentino, V. & Auwerx, J. Cytosolic Proteostasis Networks of the Mitochondrial Stress Response. *Trends in Biochemical Sciences* **42**, 712-725 (2017).
100. Ruan, L. *et al.* Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria. *Nature* **543**, 443-446 (2017).
101. Fernandez-Mosquera, L. *et al.* Mitochondrial respiratory chain deficiency inhibits lysosomal hydrolysis. *Autophagy* **0**, 1–20 (2019).
102. Balaban, R. S., Nemoto, S. & Finkel, T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* **120**,

- 483–495 (2005).
103. Lin, M. T. & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787–795 (2006).
 104. Baixauli, F. *et al.* Mitochondrial respiration controls lysosomal function during inflammatory t cell responses. *Cell Metab.* **22**, 485-498 (2015).
 105. Das, R., Ponnappan, S. & Ponnappan, U. Redox regulation of the proteasome in T lymphocytes during aging. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 541–551 (2007).
 106. Dhouafli, Z. *et al.* Inhibition of protein misfolding and aggregation by natural phenolic compounds. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 3521–3538 (2018).
 107. Fernández del Río, L., Gutiérrez-Casado, E., Varela-López, A. & Villalba, J. Olive Oil and the Hallmarks of Aging. *Molecules* **21**, 163 (2016).
 108. Rigacci, S. *et al.* Oleuropein aglycone induces autophagy *via* the AMPK/mTOR signalling pathway: a mechanistic insight. *Oncotarget* **6**, (2015).
 109. Ajami, M. *et al.* Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease and their modulation by polyphenols. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **73**, 39-47 (2017).
 110. Martínez-Huélamo, M., Rodríguez-Morató, J., Boronat, A. & de la Torre, R. Modulation of Nrf2 by Olive Oil and Wine Polyphenols and Neuroprotection. *Antioxidants* **6**, 73 (2017).
 111. Dinkova-Kostova, A. T., Kostov, R. V. & Kazantsev, A. G. The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. *FEBS Journal* **285**, 3576-3590 (2018).
 112. Rigacci, S. & Stefani, M. Nutraceutical properties of olive oil polyphenols. An itinerary from cultured cells through animal models to humans. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 843 (2016).
 113. Pannu, N. & Bhatnagar, A. Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **109**, 2237-2251 (2019).
 114. Wan, S., Zhang, L., Quan, Y. & Wei, K. Resveratrol-loaded PLGA nanoparticles: Enhanced stability, solubility and bioactivity of resveratrol for non-alcoholic fatty liver disease therapy. *R. Soc. Open Sci.* **5**, 181457 (2018).
 115. Spogli, R. *et al.* Solid dispersion of resveratrol supported on magnesium DiHydroxide (Resv@MDH) microparticles improves oral bioavailability. *Nutrients* **10**, 1925 (2018).
 116. Boocock, D. J. *et al.* Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **16**, 1246-1252 (2007).
 117. Tuck, K. L., Hayball, P. J. & Stupans, I. Structural Characterization of the Metabolites of Hydroxytyrosol, the Principal Phenolic Component in Olive Oil, in Rats. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2404–2409 (2002).
 118. Maharjan, S., Oku, M., Tsuda, M., Hoseki, J. & Sakai, Y. Mitochondrial impairment

- triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition. *Sci. Rep.* **4**, 5896 (2014).
119. Webster, G. J. M. *et al.* Longitudinal Analysis of CD8+ T Cells Specific for Structural and Nonstructural Hepatitis B Virus Proteins in Patients with Chronic Hepatitis B: Implications for Immunotherapy. *J. Virol.* **78**, 5707-5719 (2004).
 120. Heim, K. *et al.* Heterogeneity of HBV-Specific CD8+ T-Cell Failure: Implications for Immunotherapy. *Frontiers in Immunology.* **10**, 2240 (2019).
 121. Paley, M. A. *et al.* Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* **338**, 1220-1225 (2012).
 122. Im, S. J. *et al.* Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* **537**, 417-421 (2016).
 123. Huang, A. C. *et al.* T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature* **545**, 60–65 (2017).