

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali

Dipartimento di Scienze della Salute

Corso di Dottorato in Malattie Infettive

Ciclo XXVIII

**ASSOCIAZIONE TRA CALCIFICAZIONE AORTICA ADDOMINALE,  
PATOLOGIA CARDIOVASCOLARE E PATOLOGIA OSSEA IN UNA  
COORTE DI PAZIENTI CON INFEZIONE DA HIV-1**

Tesi di Dottorato di Ricerca  
Nathalie Iannotti  
Matricola N. R09992

Tutor: Prof.ssa Giulia Carla Marchetti  
Coordinatore del corso: Prof.ssa Antonella d'Arminio Monforte

Sessione straordinaria Anno Accademico 2014/2015

*Per aspera ad astra (Seneca).  
Ad Andrea e Bianca.*

## INDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUZIONE</b> .....	4
1. Infezione da HIV: trattamento e aspettativa di vita oggi .....	4
2. Immunosenescenza ed immunoattivazione: il fenomeno dell'“aging” nell'infezione da HIV .....	5
3. Comorbidità non infettive in corso di infezione da HIV-1 .....	8
3.1 Patologia ossea.....	8
3.2 Patologia cardiovascolare .....	20
3.3 Calcificazione Aortica Addominale (AAC) .....	30
<b>RAZIONALE E SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	36
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	37
1. Popolazione in studio .....	37
2. Esami di laboratorio .....	37
3. Esami strumentali.....	38
4. Esperimenti di laboratorio.....	40
5. Analisi statistiche .....	41
<b>RISULTATI</b> .....	42
1. Caratteristiche della popolazione in studio .....	42
2. Fattori demografici e comorbidità associate alla calcificazione aortica addominale .....	42
3. Fattori indipendentemente associati a fratture vertebrali nella popolazione in studio .....	44
4. Fenotipi T-cellulari associati alla presenza di calcificazione aortica addominale .....	44
5. Livelli di precursori osteoclastici circolanti nella popolazione in studio.....	45
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b> .....	46
<b>TABELLE E FIGURE</b> .....	50
<b>NOTE BIBLIOGRAFICHE</b> .....	59



## ABSTRACT

**Introduzione:** le comorbidità non infettive di natura cardiovascolare ed ossea rappresentano un problema di salute importante nella popolazione con infezione da HIV. Numerosi studi condotti su coorti miste di pazienti HIV negativi hanno dimostrato una forte associazione tra la calcificazione aortica addominale (AAC) marker di patologia cardiovascolare e la presenza di fratture vertebrali, ma non esistono dati nella popolazione con infezione da HIV. L'obiettivo del nostro studio è stato quindi quello di valutare la presenza e la distribuzione di calcificazione aortica addominale in una coorte di pazienti con infezione da HIV e la sua correlazione con la patologia cardiovascolare e la patologia ossea, identificando i fattori clinici ed immunologici associati alla presenza di AAC.

**Materiali e Metodi:** studio trasversale su 280 pazienti asintomatici con infezione ad HIV: 205/280 pazienti (73.2%) erano in terapia antiretrovirale stabilmente soppressiva.

215/280 pazienti con infezione da HIV (76.8%) non presentava AAC (AAC-: punteggio =0 all'AAC-8 score) e 65/280 (23.2%) presentava AAC (AAC+: punteggio  $\geq 1$  all'AAC-8 score). I due gruppi di pazienti sono stati studiati e comparati in termini di: caratteristiche demografiche, parametri HIV-relati, comorbidità ed immunofenotipi T-linfocitari al fine di evidenziare i fattori associati ad AAC. Sono stati inoltre: a) ricercati i possibili fattori indipendentemente associati a fratture vertebrali (FV); b) studiata la correlazione tra severità della AAC e FV; c) valutati i livelli di precursori osteoclastici (OCP) circolanti in un sottogruppo di 54 pazienti suddivisi in 4 bracci in relazione alla positività o negatività per AAC ed alla riduzione o normalità della densità minerale ossea (BMD).

**Risultati:** l'analisi statistica univariata dei parametri demografici, HIV-relati e delle comorbidità ha evidenziato come risultino associati con la AAC le seguenti variabili: l'età (ogni 10 anni in più): OR 3.81 (IC 95% 2.64-5.51)  $p < .001$ ; il BMI (ogni punto in più): OR 1.07 (IC 95% 1.00-1.14)  $p = .02$ ; il Nadir delle cellule TCD4+: OR 0.89 (IC 95% 0.82-0.97)  $p = .01$ ; gli anni di diagnosi di AIDS: OR 2.13 (IC 95% 1.11-4.08)  $p = .02$ ; essere in terapia Haart (vs naive): OR 2.75 (IC 95% 1.28-5.90)  $p = .009$ . Per quanto riguarda le comorbidità, oltre alla ben nota associazione tra AAC e patologia cardiovascolare (ipertensione: OR 3.67 (IC 95% 1.39-9.07)  $p = .008$ ; aumento cIMT o placca: OR 4.96 (IC 95% 2.59-9.50)  $p < .001$ ) nella nostra analisi sono risultati associati in maniera statisticamente significativa ad AAC la riduzione del GFR al di sotto di  $60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ : OR 4.39 (IC 95% 1.14-16.88)  $p = 0.03$ ; la riduzione della densità minerale ossea: OR 2.45 (IC 95% 1.32-4.54)  $p = 0.042$  e la presenza di fratture vertebrali ( $\text{SDI} \geq 1$ ) OR 2.17 (IC 95% 1.10-4.16)  $p = 0.02$ .

L'analisi multivariata per lo studio dei fattori indipendentemente associati alla presenza di AAC nella nostra casistica ha mostrato che solo l'età e la presenza di ispessimento della cIMT o di placca carotidea sono risultate significativamente associate alla presenza di calcificazione aortica addominale ( $p < .0001$  e  $p = 0.01$ , rispettivamente); rimane comunque una blanda associazione con la patologia ossea (BMD:  $p = 0.05$ )

L'analisi statistica univariata degli immunofenotipi T-cellulari ha evidenziato un'associazione tra AAC ed i seguenti immunofenotipi T CD8+ linfocitari: CD8+CD127+ (valori assoluti) indicativo di cellule di memoria centrale (AAC-: 377 cellule/mmc, IQR 264-540; AAC+: 434 cellule/mmc, IQR:336-698;  $p = 0.007$ ); CD8+CD45RO+ (valori percentuali e valori assoluti) espresso dai linfociti T di memoria (AAC-: 11% ,IQR 8-18; AAC+: 16.5%, IQR:9-21; AAC-: 204 cells/mmc, IQR 130-320; AAC+: 269 cells/mmc IQR 167-444;  $p = 0.04$  e  $p = 0.01$ , rispettivamente).

La AAC è risultata associata a FV in maniera indipendente rispetto ai valori di BMD ed ai livelli di vitamina D, markers di turnover osseo e PTH circolanti ( $p = 0.01$ ). Tale associazione viene persa quando si inserisce ulteriormente nel modello l'età (Modello 2, Tabella 3); in questa seconda analisi, infatti, il rischio rimane aumentato ma perde di significatività ( $p = 0.06$ ).

La correlazione di Spearman per la valutazione del rapporto tra severità della AAC e FV ha evidenziato come il grado della AAC è direttamente correlabile alla presenza ed alla severità di fratture vertebrali.

Lo studio degli OCP ha dimostrato come livelli significativamente ( $p = 0.025$ ) più elevati di precursori osteoclastici siano riscontrabili nel sangue di soggetti AAC+ e con BMD ridotto (mediana 1.8%, IQR 1.3-2.75) sia rispetto a soggetti AAC+ e con BMD normale (mediana 1.09%; IQR 0.98-1.34) ( $p < 0.05$ ) sia in confronto ad individui AAC- e con BMD ridotto (mediana 1.225%; IQR 1.06-1.34) ( $p < 0.05$ ).

**Conclusioni:** i risultati del nostro studio indicano l'esistenza di associazione tra AAC e comorbidità cardiovascolare ed ossea nella popolazione HIV-positiva. Questo suggerisce la possibilità di utilizzare la AAC come marker clinico per la precoce identificazione e l'adeguato trattamento dei soggetti a maggior rischio di sviluppare tali patologie. Pertanto il riscontro di calcificazioni (da ricercarsi con particolare cura nei pazienti anziani e con doppler dei tronchi sovra-aortici patologico) all'indagine radiografica della colonna vertebrale, dovrebbe essere necessariamente seguito da un attento studio osseo al fine di evidenziare l'eventuale presenza di fratture vertebrali o ridotta densità minerale ossea.

## INTRODUZIONE

### 1. Infezione da HIV: trattamento e aspettativa di vita oggi

Con i progressi ottenuti grazie all'utilizzo della terapia antiretrovirale potente (HAART), l'aspettativa di vita dei pazienti con infezione da HIV continua a migliorare, tanto che le persone con età superiore ai 50 anni rappresentano una quota sempre più rappresentativa di questa popolazione [1]. Nonostante sia migliorata l'aspettativa della vita, il tasso di mortalità tra le persone affette da HIV rimane da 3 a 15 volte maggiore rispetto alle persone non infette e più della metà dei decessi osservati nei pazienti con infezione da HIV in trattamento risulta correlata a comorbidità non AIDS relate, quali malattie cardiovascolari, neoplasie, fratture ossee, insufficienza renale, sarcopenia [2].

Sulla base dei dati della coorte osservazionale nazionale olandese ATHENA, condotta su più di 10000 pazienti con infezione da HIV, si prevede che, entro il 2030, il 73% dei pazienti HIV positivi avrà un'età pari o maggiore a 50 anni e che, in questo gruppo di pazienti "anziani", l'84% degli individui avrà almeno una comorbidità aggiuntiva e il 28% ne avrà almeno tre, rispetto al 19% della popolazione adulta HIV negativa [3]. Le comorbidità più rappresentate saranno le neoplasie (previste per il 17% dei pazienti), il diabete (previsto per il 17% di pazienti) e le malattie cardiovascolari (previsto per il 78% dei pazienti).

La presenza simultanea di malattia cardiovascolare, ipertensione arteriosa, fratture ossee, insufficienza renale e diabete mellito è stata associata da alcuni autori ad un fenotipo di "fragilità" associata all'età avanzata nella popolazione generale e considerato come il maggior determinante di disabilità nella popolazione generale geriatrica non infetta da HIV [4,5].

Nonostante tale fenotipo non sia ancora stato ben definito per i pazienti con infezione da HIV, la maggior frequenza con cui le comorbidità non infettive si presentano in questi pazienti, anche con 10-15 anni di anticipo rispetto alla popolazione generale, rende ormai evidente che a dispetto di una ben consolidata efficacia viroimmunologica (definita come recupero dei linfociti TCD4 ed abbattimento della carica virale, definita come HIV-RNA <50 copie/ml) la terapia antiretrovirale (ART) non sia ancora in grado di ripristinare

completamente lo “stato di salute” nei nostri pazienti [5]. Così mentre nelle decadi passate l’attenzione degli esperti si è focalizzata sul ruolo della tossicità dei farmaci antiretrovirali e sui fattori di rischio tradizionali, gli studi più recenti sottolineano il contributo del persistente stato di immunoattivazione alla morbosità ed alla mortalità anche in un contesto di controllo viroimmunologico garantito dal progresso della terapia antiretrovirale [6].

## **2. Immunosenescenza ed immunoattivazione: il fenomeno dell’“aging” nell’infezione da HIV**

L’effetto potenziale di HIV sullo stato di salute è forse più chiaramente esposto da una serie di anomalie immunologiche che persistono, nonostante l’efficace soppressione della replicazione virale. Questi cambiamenti sono in linea con alcune delle modifiche apportate al sistema immunitario adattativo, che si vedono in persone molto anziane (“immunosenescenza”) e che sono probabilmente legati in parte alla persistente infiammazione (“immunoattivazione”) legata all’azione stessa del virus HIV [5,6].

È ormai noto che molte delle anomalie delle cellule T, associate all’invecchiamento, siano simili a quelle osservate nell’infezione da HIV non trattata. Pazienti adulti non in terapia con infezione da HIV e pazienti anziani HIV negativi spesso mostrano lo stesso basso rapporto di linfociti TCD4/CD8, basso rapporto cellule naive / memoria, ridotto repertorio delle cellule T, ridotta risposta ai vaccini ed espansione delle cellule T effettrici CD28 [7,8]. Poiché molte di queste caratteristiche sono più comuni tra gli individui che non riescono a raggiungere un congruo recupero dei linfociti T CD4 + durante la terapia e poiché tale parametro è stato dimostrato essere un predittore della morbilità non AIDS correlata [6], è stato ipotizzato che l’immunosenescenza associata all’infezione da HIV contribuisca alla persistenza di immunodeficienza ed all’insorgenza precoce di malattie associate all’età, ma in epoca più precoce rispetto alla popolazione generale [2-4].

Elevati livelli di attivazione delle cellule T CD38+ (allora denominato T10) sono stati osservati fin dall’inizio in pazienti con infezione da HIV e con polmonite da *Pneumocystis* anni prima che l’HIV fosse scoperto come causa dell’AIDS [9]. Inoltre, in epoca pre-ART, marcatori solubili di attivazione immunitaria innata (quali neopterin e B2- microglobulina) così come marcatori di attivazione delle cellule TCD38+ sono risultati essere fortemente predittivi di una rapida progressione verso l’AIDS e la morte, indipendentemente da HIV



viremia e dalla conta CD4 [10,11]. L'attivazione policlonale delle cellule T osservata nella malattia da HIV non trattata non è semplicemente la conseguenza di espansione delle cellule T CD8 + specifiche per l'HIV, ma risulta piuttosto un fenomeno generalizzato riflettente l'attivazione dell'immunità innata. Infatti, markers di attivazione monocitaria cellulari (CD14 + CD16 +) e solubili (sCD163 risultano aumentati in corso di malattia da HIV non trattata e correlano con elevati livelli di immunoattivazione espressi dai linfociti TCD8 + [12].

Il ripristino immunitario indotto dalla cART, anche in soggetti stabilmente soppressi da lungo tempo, non può però, purtroppo, essere ritenuto completo come dimostrato, in numerosi studi, dal persistere di alterazioni di diversa natura. In particolare evidenze di letteratura hanno dimostrato difetti a carico del sistema monocito-macrofagico, del quadro infiammatorio sistemico e del fenotipo e funzione T-cellulari.

Il residuo di alterazioni del comparto monocito-macrofagico è dovuto all'incapacità della terapia di ripristinare la struttura della mucosa intestinale [13] e, di conseguenza, di contenere la traslocazione di frammenti microbici dall'intestino al circolo periferico dove questi possono stimolare alcune cellule dell'immunità innata [14]. In particolare, è stato dimostrato come elevati livelli di attivazione macrofagica misurata per mezzo dei marcatori solubili CD14 [15] e CD163[12] persistano in pazienti con infezione da HIV in trattamento antiretrovirale e stabilmente soppressi [16].

In maniera analoga, sono stati evidenziate alte concentrazioni di marcatori solubili d'infiammazione (beta2-microglobulina, IL-8, TNF-alfa) e di attivazione endoteliale (sICAM-1) nel circolo di pazienti che assumevano una terapia efficace da 12 anni [17].

Al di là delle alterazioni a carico del sistema monocito-macrofagico e del quadro infiammatorio sistemico, l'aspetto immunologico maggiormente studiato in corso di ART è quello relativo al fenotipo e alla funzione T-linfocitaria. In particolare, numerosi studi hanno evidenziato come le modificazioni a carico dell'omeostasi T-cellulare in corso di infezione cronica da HIV, quali la contrazione del comparto naive e central memory e l'aumento di cellule attivate, a fenotipo effector memory e terminally differentiated con conseguente morte T-linfocitaria [18], vengano solo in parte corrette dalla terapia antiretrovirale: uno studio, ad esempio, ha dimostrato la persistenza di elevati livelli di linfociti T CD4+ e CD8+ con fenotipo attivato (CD38+/HLA-DR+) dopo 3 anni di ART, nonostante una loro

riduzione nel primo anno di trattamento; tale alterazione era accompagnata dal persistente deficit di linfociti T CD4+ esprimenti la molecola costimolatoria CD28 [19].

In linea con questi risultati Hunt et al descrivono una frequenza di linfociti T CD4+ e CD8+ attivati 2 volte maggiore in soggetti trattati rispetto ai controlli negativi [20].

Infine, Brenchley et al. hanno evidenziato come la presenza di CD57 e l'assenza di CD28 sulla superficie T-linfocitaria in soggetti HIV-positivi sia naive sia trattati, si associ ad un elevato numero di pregresse divisioni cellulari e a telomeri di lunghezza ridotta, dimostrando quindi come il fenotipo T-cellulare CD57+CD28- sia esplicativo di senescenza immunologica in corso di infezione da HIV [21].

Nei pazienti con infezione da HIV in trattamento, dunque, il fenomeno di invecchiamento "accelerato" sarebbe dovuto a molteplici fattori [7,8]. L'immunoattivazione anomala e cronica può essere sostenuta dalla replicazione del virus HIV, ma probabilmente, in molti casi, è disgiunta da un processo di replicazione attiva del virus ed è legata a molteplici fenomeni non mutualmente esclusivi.

Tra le ipotesi più plausibili vi sono: (i) il danno precocissimo indotto a livello della mucosa intestinale dall'infezione da HIV che provocherebbe un danno cronico della barriera intestinale favorendo la traslocazione microbica responsabile dell'immunoattivazione; la correlazione esistente tra livelli plasmatici di LPS (o del suo recettore CD14) e grado di immunoattivazione sembra avvalorare questa ipotesi [6]; (ii) la presenza di una viremia residua: in campo virologico, la disponibilità di test per la determinazione dell'HIV-RNA con soglie di rilevazione molto più basse, ha infatti dimostrato come in molti pazienti (circa il 30-40%) persista la presenza di bassi livelli di RNA nel plasma. L'origine di questo RNA è dibattuta. Esso potrebbe derivare dall'attiva replicazione virale (in santuari?, nel plasma?) e quindi essere espressione di un certo grado di inefficacia terapeutica o, in alternativa, essere espressione di liberazione di virioni (completi?, parziali?) da parte di cellule attivate e latentemente infette senza che in realtà si attui un vero e proprio ciclo replicativo che presuppone l'infezione di nuove cellule [22,23]; (iii) la presenza di infezioni virali croniche, sostenuta dai virus erpetici. Numerosi dati infatti mostrano che l'infezione da Citomegalovirus (CMV) provocherebbe una stimolazione antigenica permanente con conseguente sviluppo di una popolazione cellulare espansa, apoptosi-resistente, di cellule T

senescenti da cui deriverebbe un sistema immune con limitata capacità di riconoscere gli antigeni e quindi di prevenire le malattie [24].

Tutto ciò determinerebbe l'insorgenza di patologie tipiche dell'età senile quali diabete, osteoporosi, malattie cardiovascolari, insufficienza renale, almeno 15 anni prima nei pazienti cinquantenni con infezione da HIV in terapia, rispetto alla popolazione generale; queste differenze andrebbero però scemando considerando i pazienti HIV e non HIV infetti con età >65 anni, suggerendo, quindi, che la popolazione con HIV di età  $\geq 50$  anni possa essere già definita "anziana" [2].

### **3. Comorbidità non infettive in corso di infezione da HIV-1**

#### **3.1 Patologia ossea**

##### **Definizioni ed epidemiologia generali**

Osteoporosi è un termine generico che significa aumentata porosità dell'osso. È caratterizzata dalla riduzione della massa ossea per unità di volume in presenza di un rapporto normale tra matrice organica e fase minerale, che conduce ad un'aumentata fragilità scheletrica, con conseguente aumento del rischio di frattura, anche spontanea [25].

Negli ultimi anni stiamo notando sempre più frequentemente il riscontro di pazienti con infezione da HIV che presentano una riduzione della massa ossea e una contemporanea disorganizzazione strutturale della colonna vertebrale, con un aumento di fratture da fragilità in assenza di traumi evidenti [26].

Il motivo principale per cui il fenomeno è attualmente sottostimato, è dato dal fatto che solitamente le fratture vertebrali non si presentano con una chiara sintomatologia dolorosa, ma si caratterizzano invece da una lenta deformazione del corpo vertebrale (con diminuzione fino al 20% della sua altezza), in assenza all'anamnesi di un evento fratturativo improvviso, con progressiva cifosi a largo raggio e dolenzia alla schiena o ai fianchi per contrattura riflessa antalgica dei muscoli paravertebrali sollecitati in modo anomalo [27].

L'osteopenia e l'osteoporosi rappresentano sicuramente le comorbidità ossee di più frequente riscontro nel soggetto con infezione da HIV [28]. Anche nei pazienti con infezione da HIV, l'osteoporosi è una malattia sistemica caratterizzata da riduzione della resistenza ossea ed aumento del rischio di fratture che la WHO definisce in relazione ai valori di densità minerale ossea (bone mineral density, BMD) misurati alla dual-energy x-

ray absorptiometry (DXA). In particolare per le donne in menopausa e per gli uomini dopo i 50 anni si parla di osteoporosi per valori di T-score minore o uguale a -2.5, dove il T-score esprime lo scostamento, in deviazioni standard, della BMD misurata rispetto alla media di BMD di soggetti sani, di pari sesso ed in età di picco di massa ossea. L'osteopenia, che rappresenta un quadro meno grave di riduzione della densità minerale ossea, invece, è definita da un T-score compreso tra -2.5 e -1 [29]. Per gli uomini al di sotto dei 50 anni e le donne in pre-menopausa, invece, è più indicato utilizzare lo Z-score (T-score corretto per età, quindi non riferito al picco di massa ossea) che sarà indicativo di bassa BMD quando  $< -2$  [29].

Se inizialmente l'osteoporosi veniva definita esclusivamente utilizzando la BMD, quindi un parametro di natura quantitativa, negli ultimi anni la NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis ha focalizzato l'attenzione sulla necessità che vi sia una contemporanea modifica qualitativa del tessuto osseo, che si traduca nella riduzione della sua resistenza. Questa è strettamente correlata al grado di turnover osseo che, essendo un evento dinamico, non può essere descritto dalla DXA; la valutazione di questo aspetto deve quindi basarsi sul dosaggio ematico o urinario dei markers di rimaneggiamento osseo [30].

Il turnover osseo è un processo di per sé fisiologico che garantisce la resistenza tissutale, riparando le microfratture che diversi tipi di stress possono provocare e che permette la mobilizzazione di calcio e fosfati (depositati sotto forma di idrossiapatite) dal loro sito di stoccaggio, al fine di assicurarne livelli ematici costanti. L'intero processo prevede il contemporaneo verificarsi di due fenomeni opposti: da una parte il riassorbimento dell'osso già formato, dall'altra la deposizione di nuovo tessuto. Del primo si occupano gli osteoclasti, sincizi appartenenti alla famiglia dei monociti/macrofagi, quindi di natura ematopoietica, che derivano dalla fusione dei loro precursori e che esercitano azione osteolitica tramite il rilascio di enzimi lisosomiali a livello del loro orletto a spazzola; del secondo sono responsabili gli osteoblasti, cellule di natura mesenchimale che assicurano la sintesi e la strutturazione della matrice extracellulare e la sua mineralizzazione, in cui rimangono poi intrappolati, trasformandosi in osteociti. La massa ossea dipende dall'equilibrio che si instaura tra la rimozione e la neoformazione ossea a livello di ciascuna unità di rimodellamento osseo e, fisiologicamente, questo equilibrio è sotto il controllo di un'ampia gamma di stimoli differenti: citochine, fattori immuni, ormoni quali il

paratormone (PTH), la calcitonina e l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) sono tutti in grado di influenzare l'attività del comparto cellulare osseo [27].

Il più importante regolatore del metabolismo osseo è il sistema OPG/RANK/RANKL (osteoprotegerin/receptor activator of NF- $\kappa$ B/RANK ligand); RANKL è un fattore solubile prodotto dagli osteoblasti e dalle cellule stromali del midollo che, legandosi a RANK espresso sulla superficie dei precursori degli osteoclasti ne induce la differenziazione. L'OPG invece, è una proteina appartenente alla famiglia del TNF che, prodotta dagli osteoblasti, è in grado di legare RANKL sottraendolo alla possibilità d'interazione con RANK ed inibendo così il riassorbimento osseo [31]. Qualsiasi evento, di natura infettiva, ormonale, immunologica o metabolica, che turbi questo accoppiamento determinando il prevalere dell'attività osteoclastica su quella osteoblastica, porta ad una riduzione della BMD, ad una modifica della struttura ossea e di conseguenza ad un incremento del rischio di fratture da fragilità [30-32]

### **Studi clinici ed eziopatogenesi del fenomeno nella popolazione con infezione da HIV**

Numerosi studi hanno dimostrato che le persone con infezione da HIV sono ad aumentato rischio di osteoporosi. Un'importante meta-analisi condotta su 884 pazienti e pubblicata nel 2006 da Brown et al. ha mostrato che i pazienti con infezione da HIV hanno un aumento del rischio di sviluppo di osteoporosi superiore di 3.7 volte rispetto ai pazienti immunocompetenti [33]. Questo stesso lavoro mette anche in evidenza che i pazienti HIV positivi in terapia antiretrovirale presentano un OR (odds ratio) per ridotta BMD 2.5 volte superiore rispetto a quello di soggetti naive al trattamento e che il rischio di patologia ossea è diverso a seconda dei regimi terapeutici utilizzati, poiché maggiore è per pazienti in terapia con inibitori delle proteasi (PI) rispetto a quelli che non li utilizzano [33].

Recentemente Escota et al, utilizzando i dati di un grosso studio di popolazione condotto su 653 partecipanti HIV-positivi (SUN Study) e comparandoli con i controlli sani della National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), ha evidenziato una maggiore prevalenza di bassa BMD femorale nel primo gruppo di pazienti rispetto ai controlli HIV negativi (47% vs 29%  $p < 0.001$ ). Selezionati poi 170 soggetti in ART stabilmente soppressi e, valutandone il cambiamento di BMD nell'arco di 4 anni, lo studio

dimostra in questo stesso arco di tempo una perdita di massa ossea sostanziale (BMD  $\geq 5\%$  rispetto al basale) nel 31% dei casi [34].

Che la terapia antiretrovirale possa avere un impatto negativo sull'osso e che questo possa eccedere l'azione "osteotossica" di HIV stesso è dimostrato ampiamente dallo studio SMART, che, confrontando due gruppi di pazienti HIV, uno con assunzione continua di ART e l'altro con assunzione intermittente, ha evidenziato come nel primo i valori di BMD fossero significativamente più bassi, e l'incidenza di fratture fosse più alta, rispetto al secondo [35].

Tra i farmaci più implicati nel danno osseo, oltre ai vecchi NRTIs (inibitori nucleosidi(tidici della trascrittasi inversa) costituenti fondamentali del cosiddetto backbone della terapia in ogni linea guida di terapia antiretrovirale, per via degli effetti collaterali che originano dalla loro azione tossica a livello mitocondriale) merita sicuramente un discorso a parte il tenofovir (TDF) [26].

Questo analogo nucleotidico ha un'azione inibitoria sulla DNA-polimerasi- $\gamma$  veramente bassa, ma che può produrre un danno osseo attraverso meccanismi eziopatogenetici diversi, che comprendono la riduzione del filtrato glomerulare, GFR (con la riduzione del GFR si riduce l'attività dell'alfa-1 idrossilasi renale, con conseguente ridotta produzione di 1,25(OH) $_2$ -vitamina D), la tossicità tubulare (con ipofosfatemia e iperfosfaturia), l'attivazione osteoclastica e l'aumento dei marcatori di turnover osseo, tutte situazioni in grado di indurre deplezione dei fosfati e perdita di massa ossea. [26,36]. L'utilizzo di tenofovir è stato associato ad una maggiore riduzione della BMD rispetto ad altri NRTI [37,38] e la cui esposizione si è dimostrata un indicatore predittivo indipendente di aumentato rischio di fratture da fragilità [39]. Altrettanto importante e documentata appare la già citata azione dannosa sull'osso da parte degli inibitori delle proteasi.

Brown e Qaqish [33] hanno confermato questa ed altre osservazioni riportando, nei pazienti trattati con PI, un rischio di osteoporosi aumentato di 1,6 volte, rispetto a quelli che non assumono questi farmaci. Esistono evidenze in vitro circa la capacità dei PI di inibire il differenziamento, in senso osteoblastico, delle cellule stromali, le quali, di conseguenza, vengono dirottate verso un destino cellulare adipocitario: da ciò deriva una ridotta neo-deposizione di osso. Anche il riassorbimento osseo osteoclasto-mediato riceve un'accelerazione da parte di questi farmaci. Alcuni lavori in vitro hanno dimostrato una

marcata mobilitazione del calcio da colture ossee trattate con i PI, mentre altri hanno evidenziato sia un incremento delle citochine pro-osteoclastogenetiche, sia un'aumentata attivazione del sistema RANKL-OPG-TRAIL, che è il regolatore del reclutamento, della differenziazione e dell'attivazione dei precursori osteoclastici [26,33,39].

Un'altra azione potenzialmente negativa dei PI è quella di inibire l'attività enzimatica dei citocromi P450. Il metabolismo della vitamina D, infatti, dipende sull'attività di due di questi enzimi: la 25(OH)- e la 1,25(OH)-idrossilasi, che attraverso la loro azione permettono, rispettivamente, la conversione epatica del colecalciferolo in 25(OH)-vitamina D e la produzione renale della 1,25(OH) 2-vitamina D, detta anche calcitriolo. La carenza di questo importante ormone può causare la comparsa di osteoporosi [25].

I dati della coorte Italiana Nazionale IcoNa mostrano che nonostante l'età relativamente giovane della nostra popolazione con infezione da HIV, la prevalenza di ipovitaminosi era alto: livelli insufficienti di vitamina D (30-75 nmol/L): 47% dei casi; deficit di vitamina D (<30 nmol/L): 6% dei casi [40].

Il principale rischio che corre una persona con osteoporosi è quello della frattura spontanea o da trauma minimo che, per una donna di 50 anni d'età, arriva a superare addirittura il 50%; infatti, il rischio di presentare una frattura nell'arco della vita è doppio per le donne rispetto agli uomini [26]. Tuttavia, solo un quarto di queste fratture risulta clinicamente evidente, poichè in gran parte sono asintomatiche e, quindi, non arrivano all'attenzione clinica e si trovano solo con la radiografia della colonna [41]. Anche se non sono clinicamente evidenti, le fratture vertebrali subcliniche possono impattare significativamente sulla qualità di vita del paziente e comportano un aumento di cinque volte e di tre volte del rischio di successive fratture vertebrali e dell'anca, rispettivamente [42]; esse inoltre sono anche associate con un aumento dei tassi di mortalità [43].

Gazzola et al [44] hanno condotto uno studio su 194 pazienti con infezione da HIV sottoposti a Rx colonna vertebrale e a DXA ed hanno evidenziato una prevalenza di fratture pari al 12.4%; interessante notare che i 2/3 delle fratture si sono verificate in pazienti non identificati come osteoporotici. Ancora in un'analisi retrospettiva italiana, Torti et al [45], hanno riportato una prevalenza di fratture vertebrali/deformità del 26,9% in pazienti affetti da HIV significativamente più elevate rispetto ai controlli (12.9%); Borderi et al [46], hanno invece osservato una prevalenza pari al 23,3% di fratture vertebrali subcliniche in una

coorte di 202 pazienti con infezione da HIV. Data l'elevata prevalenza del genere, gli autori italiani hanno suggerito che il danno osseo nella popolazione con infezione da HIV possa essere superiore a quella osservato con le misurazioni DXA, anche se l'indisponibilità dei dati BMD in entrambi gli studi non ha permesso alcuna conclusione.

Bisogna poi considerare che nella popolazione con infezione da HIV anche il rischio di fratture da fragilità aumenta considerevolmente in relazione all'eventuale assunzione ed al tipo di cART. Come già anticipato un'esposizione cumulativa al tenofovir, rispetto ad altri regimi che ne sono privi, può esserne responsabile con un rischio addizionale del 12% all'anno, mentre altri tipi di NRTI o gli NNRTI non sembrano avere ad un'analogia azione. Notevole appare invece il potenziamento del rischio quando si associa l'assunzione del tenofovir a quella di un PI boosterato con ritonavir rispetto ad una terapia contenente solo una tra le due tipologie di farmaci [39].

### **Studi sperimentali**

Sicuramente la popolazione con infezione da HIV presente più frequentemente alcuni tra i più importanti fattori di rischio per ridotta massa ossea: basso BMI, stili di vita sedentari, fumo, abuso alcolico, terapie steroidee prolungate e ridotto apporto dietetico di calcio e vitamina D sono solo alcuni di questi [47].

Il bilancio osseo è dato dal complesso equilibrio dell'attività osteoblastica ed osteoclastica. Molti studi hanno dimostrato la responsabilità diretta dell'HIV nella patogenesi dell'osteoporosi, con meccanismi che coinvolgono entrambe queste componenti. Dal punto di vista osteoblastico, ci sono evidenze che l'HIV inibisca sia la differenziazione e la proliferazione del precursore stromale in osteoblasto, sia l'osteoblasto stesso, e stimoli nel contempo i fenomeni di perdita delle proteine della matrice e di demineralizzazione, tipici dell'apoptosi osteoblastica. Dal punto di vista, invece, osteoclastico, altri dati confermano la relazione diretta tra livelli di HIV-RNA plasmatico, l'aumento della concentrazione di alcune citochine della famiglia del TNF (RANKL, OPG, TRAIL) e la perdita di massa ossea. Il tutto si traduce in un aumento dell'attività di riassorbimento da parte degli osteoclasti, ed in una contemporanea riduzione dell'attività di neoformazione da parte degli osteoblasti, con un bilancio finale inevitabilmente negativo [26]. Il riscontro di positività per HIV alla PCR a seguito di trapianto osseo da donatore infetto e la dimostrata capacità di



HIV di infettare in vitro delle cellule simili agli osteoblasti, ha portato ad ipotizzare che queste cellule potessero rappresentare dei bersagli per il virus e che questo potesse danneggiarle attraverso un meccanismo replicativo diretto. Tuttavia, esistono evidenze discordanti a tale riguardo come, ad esempio, l'impossibilità di trovare il genoma virale di HIV negli osteoblasti estratti da pazienti con infezione. Un'eventuale mancanza di suscettibilità degli osteoblasti nei confronti del virus potrebbe essere spiegata da un'incompatibilità strutturale tra le molecole di superficie di entrambe le controparti che dovrebbero garantirne l'interazione [26]. HIV è in grado di rendere disfunzionale il comparto osteoblastico anche attraverso altri meccanismi che vanno dall'induzione dell'apoptosi, al contrasto della loro attività, ad una riduzione della differenziazione dei loro precursori. Il TNF-alfa prodotto dagli osteoblasti stimolati dalla gp120 virale, in particolare, agirebbe con meccanismo autocrino/paracrino innescando la cascata apoptotica nelle cellule in vitro [48]. Un altro importante ruolo della gp120, assieme a p55-gag, sembra essere quello di inibire l'attività degli osteoblasti, riducendo la deposizione di calcio, la produzione di fosfatasi alcalina ed osteocalcina [49]. L'azione virale, però, si esplica anche a monte delle cellule osteoblastiche ovvero direttamente a livello dei loro progenitori mesenchimali che mostrano ridotta proliferazione e sopravvivenza. Contestualmente si verifica una riduzione della loro differenziazione verso la linea cellulare ossea ed un incremento verso quella adipocitaria per induzione dell'espressione di PPAR-gamma: entrambi i fenomeni sono gp-120 mediati [49,50].

Gli effetti di HIV sugli osteoclasti sono altrettanto numerosi; in quest'ambito è importante sottolineare un probabile ruolo indiretto del virus sull'osso, mediato dall'attivazione di uno stato infiammatorio da parte dell'infezione. Gli stessi linfociti T che si attivano nella risposta anti-HIV, infatti, producono RANKL e citochine pro-infiammatorie, quali TNF-alfa e IL-6, in grado di promuovere l'attività osteoclastica e di indurre l'apoptosi degli osteoblasti [41].

È stata inoltre descritta l'esistenza di un meccanismo di potenziamento tra virus e RANKL: la gp120 del primo, infatti, sarebbe in grado di aumentare l'espressione di RANKL da parte delle cellule del sistema immunitario, primi tra tutti i linfociti T ma, dall'altro canto, RANKL rappresenterebbe un fattore in grado di favorire la replicazione virale [26].

Infine un ruolo chiave nell'exasperazione del lavoro osteoclastico è quello assunto dall'M-CSF (macrophage colony stimulating factor) fattore di crescita emopoietico coinvolto nella differenziazione degli osteoclasti. Infettando i macrofagi, l'HIV ne induce un'iper-secrezione con conseguenze importanti su diversi piani: in primo luogo promuove un'ulteriore infezione dei macrofagi perché aumenta l'espressione di CCR5; in secondo luogo potenzia l'effetto di RANKL; infine down-regola la produzione di OPG contribuendo ulteriormente al riassorbimento osseo [26].

Il contributo al danno osseo fornito dallo stato di immunoattivazione che caratterizza l'infezione da HIV, è stato dimostrato in diversi studi; uno di questi, arruolando pazienti HIV-infetti sia con BMD ridotto che normale, evidenzia non solo come i primi presentino incrementati valori di linfociti T CD4+ e CD8+ attivati (esprimenti il fenotipo HLA-DR+) rispetto ai secondi, ma anche come lo stato di immunoattivazione sia un fattore predittivo indipendente di osteopenia/osteoporosi [51].

Erlanson et al non mostrano una correlazione significativa tra ridotta massa ossea e rialzo di markers infiammatori (IL-6, TNF-alfa, usPCR, D-dimero, RANKL, OPG) o espressione di un immunofenotipo T-cellulare o monocitario attivato [52]. Tutto ciò suggerisce la necessità di nuovi studi che possano meglio definire gli ipotizzati rapporti tra danno osseo ed immunoattivazione ed infiammazione in soggetti HIV-positivi [52].

Parte dei fenomeni immunitari ritenuti responsabili della comorbidità ossea sono imputabili anche alle modifiche dell'assetto immune indotte dall'introduzione terapia antiretrovirale. Questo è stato ipotizzato in base alla constatazione che, indipendentemente dal regime impiegato, tutti i soggetti trattati vanno incontro a un calo del 2-6% del BMD all'inizio della terapia con tendenza alla stabilizzazione o all'incremento a due anni di distanza [33].

Le due categorie farmacologiche che, nel loro insieme, impattano maggiormente sul metabolismo osseo sono quelle degli NRTI e dei PI, come già precedentemente dettagliato [26, 53, 54].

## **Pratica clinica**

Lo screening per la patologia ossea nel paziente con infezione da HIV ad oggi è fortemente raccomandato dalle linee guida nazionali ed internazionali [55,56] ed anche le ultime linee guida italiane raccomandano di sottoporre tutti i pazienti infetti da HIV ad uno screening mirato all'identificazione di quelli con più alta probabilità di sviluppare patologia ossea.

A tal fine è necessario innanzitutto ricercare la presenza di eventuali fattori di rischio. Quelli classici per osteoporosi sono numerosi e comprendono: ipogonadismo, ipertiroidismo, familiarità per fratture femorali, pregresse fratture per traumi minimi, BMI (body mass index)  $<19 \text{ kg/m}^2$ , ipovitaminosi D, fumo, alcol, assunzione di steroidi, sedentarietà, età avanzata, razza caucasica, sesso femminile, menopausa/amenorrea. Anche un calo staturale di 4cm pone il sospetto di cedimenti vertebrali e deve essere indagato con un'RX della colonna in proiezione laterale. Rientra in questa prima fase di indagini la valutazione del metabolismo osseo mediante parametri laboratoristici quali: il dosaggio plasmatico della 25-OH vitamina D, da eseguire preferenzialmente in inverno o primavera; la determinazione del PTH, spesso aumentato secondariamente ad un deficit di vitamina D; il dosaggio dai markers di riassorbimento osseo, soprattutto del telopeptide; la valutazione comparata di fosfatemia e calcemia (corretta per l'albumina) con fosfaturia e calciuria. Tutto questo ci permette di escludere eventuali forme di osteoporosi secondaria [14]. Il dosaggio del fosforo urinario, associato alla stima del GFR (glomerular filtration rate), è particolarmente importante nei soggetti in trattamento con tenofovir, data la nefrotossicità del farmaco [68].

Il passo successivo sarà, per i casi in cui ve ne sia indicazione, il ricorso ad indagini strumentali come DXA ed RX. La DXA (Dual X-ray Absorptiometry), eseguita a livello della colonna lombare e del collo femorale, rappresenta il gold-standard per la valutazione della BMD quale principale indicatore del rischio di fratture. Proprietà principe della metodica è la capacità di discriminare tra l'osso trabecolare e quello corticale che sono diversamente colpiti dal processo osteoporotico. L'esame dovrebbe essere eseguito in tutti i pazienti in cui per la prima volta si diagnostichi l'infezione da HIV (baseline) [68] ed in tutte le donne in menopausa, gli uomini di età maggiore ai 50 anni, i soggetti con anamnesi positiva per frattura osteoporotica, gli individui in terapia steroidea orale per più di 3 mesi, coloro che abbiano a 10 anni un rischio fratturativo  $>10\%$  stimato con algoritmo FRAX. La tempistica di ripetizione dell'indagine, qualora ve ne fosse necessità, viene stabilita in

relazione ai valori di BMD ottenuti: 1-2 anni con T-score tra -2.0 e -2.49, 5 anni con T-score tra -1.01 e -1.99 [14].

Il rischio di fratture può essere abbastanza accuratamente stimato attraverso il ricorso al FRAX (Fracture Risk Assessment) tool, un algoritmo elaborato dalla WHO che, integrando una serie di informazioni su fattori di rischio clinici (età, sesso, BMI, fumo, alcol, terapia steroidea, storia familiare di fratture ecc) con il valore di BMD a livello del collo femorale, fornisce la probabilità di frattura a 10 anni. Il FRAX score può essere utilizzato anche come strumento per l'identificazione di soggetti da sottoporre a DXA, omettendo in tal caso, di inserire il valore di BMD. Questo algoritmo tuttavia non è validato per soggetti di età <40 anni e, soprattutto, essendo mutuato dalla popolazione generale, non tiene in conto dell'infezione da HIV e della terapia quali fattori in grado di influenzare il rischio fratturativo portando ad una sua sottostima nei pazienti HIV+ [67].

Uno screening della riduzione della BMD e una valutazione del rischio di fratture possono essere fornite anche dalla QUS (calcaneal quantitative ultrasound), come dimostrato da un recente studio comparativo dei parametri DXA e QUS in una coorte di pazienti HIV-positivi: i risultati ottenuti indicano una capacità predittiva del rischio di fratture sovrapponibile a quella della DXA, in particolar modo per il sottogruppo di donne in menopausa. Inoltre la sua facilità d'impiego, la sua non invasività ed il suo basso costo la rendono un eccellente candidato a metodica di selezione di quei soggetti a maggior rischio da sottoporre a DXA, permettendo di contenere i costi legati all'esecuzione di quest'ultimo esame [85].

La morfometria della colonna toracica e lombare, infine, ha l'obiettivo di valutare la presenza di cedimenti somatici e deve essere eseguita in tutti i soggetti con recente diagnosi di HIV (baseline) [68], nelle donne in menopausa e negli uomini di età compresa tra i 50 e i 69 anni che presentino specifici fattori di rischio: positività anamnestica per frattura osteoporotica, calo staturale >4cm, terapia steroidea prolungata [14]. L'intervallo di tempo per la ripetizione di un secondo RX verrà valutato dal medico in relazione al quadro del singolo paziente [68].

## Terapia

La gestione del paziente identificato dallo screening come ad alto rischio consta di una serie di provvedimenti di natura farmacologica e non. I primi ai quali si ricorre sono gli interventi sullo stile di vita, mirati alla modifica o all'adozione di comportamenti rispettivamente in grado di impattare in modo negativo o positivo sul metabolismo osseo. La sospensione del fumo e dell'abuso d'alcol, un'attività fisica regolare e la prevenzione della magrezza eccessiva (BMI <18.5) attraverso un apporto calorico adeguato ne sono degli esempi [14]. Particolare importanza rivestono le indicazioni dietetiche da fornire al paziente al fine di garantire un'assunzione giornaliera soddisfacente di calcio e vitamina D. L'apporto quotidiano di calcio dovrebbe essere di 1000 mg per uomini dai 50 ai 70 anni e di 1200 mg per donne di età maggiore o uguale ai 51 anni o uomini di età maggiore o uguale a 71 anni [86]; qualora la sola dieta si presentasse insufficiente a garantire tali livelli, è utile ricorrere alla supplementazione giornaliera di 1 gr di calcio [14].

Anche deficit di vitamina D che permangano nonostante adeguato regime dietetico richiedono una correzione appropriata a riportare i livelli plasmatici di 25-OH vitamina D a valori di almeno 30 ng/ml [86]. Le linee guida italiane suggeriscono una supplementazione con colecalciferolo che faccia riferimento ad uno schema generale in cui, ad un primo bolo volto al ripristino dei normali livelli di vitamina circolanti, faccia seguito una dose settimanale di mantenimento a dosaggi da stabilirsi in relazione all'entità del deficit. Quando possibile l'efficacia dell'intervento dovrebbe essere appurata attraverso una nuova valutazione della 25-OH vitamina D a 6 mesi di distanza. Le uniche controindicazioni all'uso di colecalciferolo sono un'anamnesi positiva per calcolosi o un calcio ionizzato superiore ai limiti di normalità [68].

Altro aspetto fondamentale nella gestione del paziente ad alto rischio di fratture è rappresentato dall'ottimizzazione della terapia antiretrovirale sia in termini di efficacia, in quanto la replicazione virale è di per sé un fattore indipendente di perdita di massa ossea [69], sia in termini di tossicità. Qualora un paziente presenti un quadro di riduzione della BMD, dopo aver corretto tutti i possibili fattori di rischio ed aver escluso le possibili cause di osteopenia/osteoporosi secondaria, è possibile, previo accertamento dell'esistenza di valide alternative, prendere in considerazione un cambio terapeutico. Questo vale soprattutto per i regimi contenenti tenofovir per il quale, rispetto ad altre molecole

antiretrovirali, esiste una documentata maggiore tossicità ossea che si estrinseca soprattutto nel primo anno di terapia, nei soggetti pretrattati e nelle associazioni con PI/r. La valutazione della modifica terapeutica deve essere condotta tenendo presente che: l'uso di abacavir/lamivudina determina una minor perdita ossea rispetto a quello di tenofovir/emtricitabina; tra i farmaci "di sostegno" atazanavir/r impatta maggiormente sulla BMD a livello lombare rispetto ad efavirenz; gli inibitori delle integrasi danneggiano meno l'osso sia rispetto ai PI/r sia quando associati ai PI/r nell'ambito di regimi NRTI-sparing [14].

Infine, nei casi in cui ne sussistano le necessarie condizioni, in maniera del tutto sovrapponibile a quanto vige nella popolazione generale, anche per i soggetti HIV-infetti è giustificato il ricorso a terapie farmacologiche specifiche per il trattamento dell'osteoporosi. I pazienti candidabili a quest'ultimo tipo di intervento sono in genere individuati sulla scorta del loro elevato rischio di fratture a 10 anni che deve essere calcolato tenendo in considerazione non solo i valori di BMD forniti dalla DXA ma anche la presenza di fattori di rischio individuali (soprattutto pregressa frattura da fragilità o terapia steroidea cronica) [63].

I principali farmaci utilizzati sono i bifosfonati ed in particolare l'alendronato e l'acido zoledronico in quanto uniche molecole della famiglia ad essere state studiate nei soggetti HIV-infetti [86]. I bifosfonati agiscono legandosi alle superfici ossee in rimodellamento e bloccando l'attività osteoclastica con meccanismi differenti a seconda del tipo di farmaco in questione. Non esistono indicazioni precise sulla durata del trattamento ma in genere è proposta una sua rivalutazione a 5 anni di distanza, soprattutto per scongiurare il rischio di insorgenza dei gravi, seppur rari, effetti di una prolungata inibizione del turnover osseo, come l'osteonecrosi della mandibola o fratture atipiche del femore [86].

Terapie di seconda linea ma ancora troppo poco studiate nella popolazione sieropositiva sono rappresentate dal denosumab, anticorpo monoclonale anti-RANKL, dai modulatori selettivi dei recettori degli estrogeni (SERMs) e dalla terapia ormonale sostitutiva con azione anti-riassorbitiva, dallo stronzio ranelato, con potere anti-riassorbitivo ed anabolico, dal PTH ricombinate umano (teriparatide), anch'esso ad azione anabolica [68].

## **3.2 Patologia cardiovascolare**

### **Definizioni ed epidemiologia generali**

Le patologie cardiovascolari rappresentano la prima causa al mondo di morte e, da sole, giustificano i 17.5 milioni di decessi, pari al 31% del totale, del 2012 [58]. Si tratta di differenti patologie caratterizzate da un prevalente interessamento cardiaco, come nelle cardiopatie congenite e nella malattia reumatica, e/o vascolare come nella coronaropatia, nella patologia cerebrovascolare, nella arteriopatia periferica o nella trombosi venosa profonda ed embolia polmonare. Tra tutte, le forme più frequenti sono la malattia coronarica e le cerebrovasculopatie che, spesso, fanno il loro esordio clinico in maniera acuta configurando, rispettivamente, i quadri dell'infarto miocardico acuto (IMA) e dello stroke cerebrale, ischemico o emorragico. In entrambi i casi il principale substrato patologico che ne è alla base è l'aterosclerosi, malattia infiammatoria sistemica dei vasi arteriosi di grosso e medio calibro le cui caratteristiche distintive sono individuabili in un ispessimento dell'intima e nella formazione di placche conseguenti all'accumulo di lipidi nella parete vasale [59,60]. All'origine delle tipiche alterazioni strutturali che ne derivano, si possono riconoscere attori molteplici e diversi che vanno dalle lipoproteine alle cellule ematiche, dalle componenti delle pareti vasali alle cellule del sistema immunitario e che, coordinati da un esteso network citochinico, interagiscono tra loro nel processo di genesi della placca aterosclerotica. La corrispondenza tra la maggior parte dei mediatori e delle cellule effettrici coinvolti in questo scenario con quelli riscontrabili nei processi di natura infiammatoria, induce a ritenere l'aterosclerosi una patologia sostenuta da uno stato infiammatorio cronico al quale contribuiscono i numerosi fattori di rischio classicamente associati, cioè la sedentarietà, una dieta poco sana, il fumo, l'abuso alcolico che possono a loro volta essere causa di "fattori di rischio intermedi" quali l'ipertensione, l'ipercolesterolemia, il diabete, l'obesità [58, 59]. Questi ultimi rappresentano dei veri e propri stimoli aterogeni in quanto, con meccanismi differenti, sono in grado di danneggiare la funzione delle cellule endoteliali provocandone una modifica delle fisiologiche proprietà vasodilatatrici, antitrombotiche, antiaggreganti ed inibitrici della proliferazione delle cellule muscolari attraverso l'abnorme produzione endoteliale di specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed il sovvertimento del normale equilibrio tra produzione endoteliale di sostanze vasodilatatrici, quali ossido nitrico

(NO) e prostaciline (PGI<sub>2</sub>), e molecole vasocostrittrici, come l'endotelina 1 (ET-1), a favore di quest'ultime.

In questo contesto si verifica un aumento della permeabilità endoteliale che favorisce un reclutamento di lipoproteine a bassa densità (LDL) circolanti in sede subintimale. L'accumulo di queste particelle, particolarmente ricche di colesterolo e trigliceridi, coincide con la comparsa delle cosiddette "fatty streaks", ritenute le lesioni iniziali del processo aterosclerotico. Quando le LDL abbandonano il circolo ematico per depositarsi nella parete vasale, perdono il contatto con le sostanze antiossidanti in esso presenti e vengono facilmente trasformate in LDL-ossidate sia dall'azione dei ROS che di enzimi specifici, come la PLA<sub>2</sub> (fosfolipasi A<sub>2</sub>), che sono prodotti dalle cellule infiammatorie. Le LDL-ossidate inducono l'espressione endoteliale di molecole di adesione (selectine, VCAM-1, ICAM-1) e la produzione di chemochine (fattori del complemento, IL-8, MCP-1) capaci di legare cellule circolanti, tra cui monociti, linfociti e piastrine, e di favorirne il passaggio transendoteliale. In sede subintimale i monociti si differenziano in macrofagi e questi ultimi, dopo esserci infarciti di LDL-ossidate, assumono l'aspetto delle classiche "foam cells" che, insieme a linfociti, piastrine e cellule muscolari lisce, contribuiscono alla formazione delle placche ateromasiche. Tra le numerose altre azioni delle LDL-ossidate degne di note si ricordano la produzione di citochine infiammatorie, un'azione citotossica diretta sui costituenti della placca, l'induzione di un assetto pro-coagulante per incremento della sintesi di ET-1 ed inibizione di quella di NO. Un passaggio fondamentale nell'evoluzione naturale delle lesioni aterosclerotiche è il reclutamento delle cellule muscolari lisce che, indotte da citochine e fattori di crescita come il FGF (Fibroblast Growth Factor), migrano dalla tonaca media della parete vasale sino all'intima, dove proliferano attivamente e, sotto stimolo del TGF-beta (*transforming growth factor-beta*), producono abbondante matrice interstiziale: il risultato netto è la formazione di una lesione fibroadiposa. Man mano che questa si accresce ed evolve verso la formazione della placca matura, alcune delle foam cells muoiono per apoptosi ed i lipidi che rilasciano, generano il nucleo, spesso colliquato, della lesione. Inoltre, lo stato infiammatorio vascolare, induce una iper-espressione di metalloproteasi che, danneggiando il cappuccio fibroso della lesione ed il sovrastante endotelio, possono portare all'esposizione della matrice extracellulare altamente trombogena al torrente ematico e provocare la formazione di microtrombi piastrinici; questi possono accrescersi con gradi di



entità differente ai quali corrispondono riduzioni più o meno critiche del lume vasale. Le manifestazioni cliniche che ne derivano vanno da forme totalmente silenti, a quadri ischemici di diversa gravità, fino all'infarto miocardico acuto in caso di trombosi totalmente occlusiva [59,60].

### **Studi clinici ed eziopatogenesi del fenomeno nella popolazione con infezione da HIV**

Una grande quantità di evidenze nella letteratura scientifica sostiene l'osservazione epidemiologica di un aumento di morbosità e mortalità correlata a malattie cardiovascolari cliniche e sub - cliniche nei pazienti HIV nell'era della terapia antiretrovirale [61]. Un rischio significativamente più alto di infarto miocardico acuto (IMA) è stato osservato nei pazienti con infezione da HIV (appaiati a controlli non infetti simili per caratteristiche demografiche ed esposizione a fattori di rischio comportamentali) rispetto ai non infetti nella coorte VACS che ha analizzato i dati di 82.459 pazienti veterani seguiti per una media di 5.9 anni; inaspettatamente il rischio più alto è stato riscontrato nei pazienti in terapia e con HIV-RNA < 500 copie/ml [62].

Anche Silverberg et al. [63] hanno riportato un più alto rischio di IMA tra i pazienti HIV + con bassa conta corrente o basso nadir dei linfociti TCD4 (<200) rispetto ai pazienti non HIV in uno studio di coorte che comprendeva 22.081 sieropositivi e 230.069 soggetti HIV negativi. In contrasto, Klein et al. [64] hanno riportato un calo di eventi CVD nei pazienti con infezione da HIV come osservato dall'analisi dei dati del Kaiser Permanente Southern California condotta su 24.768 pazienti HIV e 257.600 controlli. Con questi dati il rischio relativo aggiustato di IMA in pazienti HIV + è sceso da 1,8 nel 1996-1999 a 1,0 nel 2010-2011 probabilmente a causa del controllo nell'analisi dei tradizionali fattori di rischio cardiovascolare, la minore incidenza di grave immunodeficienza, e l'uso di farmaci antiretrovirali a minor impatto sui lipidi nei pazienti arruolati in questo studio.

Altrettanto indagata è la correlazione tra HIV e patologia cardiovascolare subclinica: a tal fine la misura del CAC (coronary artery calcium) o del cIMT (carotid intima-media thickness) sono, in genere, utilizzate come strumenti di valutazione dell'aterosclerosi. I risultati degli studi al riguardo sono abbastanza discordanti e, accanto a quelli che riportano un'associazione significativa tra infezione e livelli di CAC, ispessimento della cIMT,

progressione temporale della stessa, lesioni carotidee ve ne sono altri che giungono a conclusioni diametralmente opposte [65].

Il più grande contributo all'indagine sul possibile ruolo della terapia antiretrovirale sul rischio di patologia cardiovascolare proviene dal D:A:D study (Data Collection of Adverse events of Anti-HIV Drugs) che, analizzando i dati di oltre 3300 soggetti con infezione da HIV contenuti nel più grosso database sui fattori di rischio cardiovascolare, giunge ad evidenziare un aumento del rischio CVD nei pazienti in terapia rispetto ai naive, come giustificato dai più elevati livelli di colesterolo totale e trigliceridi nel primo gruppo rispetto al secondo [66].

Infine, anche all'interno della stessa popolazione HIV-sieropositiva il rischio di patologie cardiovascolari sembra variare in relazione a diversi fattori: sesso, età e coinfezioni rappresentano degli esempi particolarmente indagati. I dati attualmente a disposizione indicano un rischio maggiore di comorbidità cardiovascolare nel genere femminile rispetto al maschile [67] e nei soggetti più giovani rispetto agli adulti [67]. Analogamente la presenza di coinfezioni sembra elevare la soglia di rischio al di sopra di quella identificata dalla sola infezione da HIV; a tale conclusione sono giunti alcuni studi su pazienti HCV/HIV positivi [68,69]. Nei soggetti con infezione da HIV/HSV-2 è inoltre stato riscontrato un rischio di aterosclerosi, valutato con il CAC score, 4 volte superiore a quello di pazienti esclusivamente HIV-positivi [70]; infine in una coorte di donne con infezione da HIV è stata dimostrata una correlazione statisticamente significativa tra livello di anticorpi anti-CMV circolanti e ridotta elasticità e distensibilità carotidea, ma non tra titolo anticorpale e cIMT o lesioni carotidee [71].

Molti fattori possono contribuire all'aumento dell'incidenza di malattia cardiovascolare nei pazienti con infezione da HIV: le determinanti tradizionali della malattia (fumo di sigaretta, diabete mellito, dislipidemia, obesità, ipertensione sistemica, vita sedentaria, lo stress e la storia familiare di coronarica o malattia vascolare) sembrano essere più comuni nei pazienti HIV positivi rispetto alla popolazione negativa [66,72,73]. Inoltre alterazioni di regolazione dell'omeostasi del glucosio e del metabolismo lipidico e la sindrome metabolica sono spesso correlati con la terapia antiretrovirale e sono più elevati nei pazienti trattati con farmaci antiretrovirali più vecchi e più tossici [74].

## **Studi sperimentali**

L'elevato rischio di patologie cardiovascolari osservato nel corso dell'infezione da HIV non può essere spiegato solo dai fattori sopra menzionati. Diversi studi hanno anche osservato che le co-morbidità, come quella cardiovascolare, che sono normalmente presenti più tardi nella vita degli individui immunocompetenti a causa dell'invecchiamento naturale, stanno emergendo sempre più frequentemente nella popolazione con infezione da HIV [1,5]. Queste osservazioni hanno portato all'ipotesi che i pazienti affetti da HIV vadano incontro ad invecchiamento precoce e accelerato probabilmente guidato da effetti collaterali dei farmaci antiretrovirali, dall'infiammazione cronica e dall'attivazione immunitaria persistente. Indubbiamente un ruolo fondamentale nello sviluppo di invecchiamento accelerato del sistema cardiovascolare e nella patogenesi della CVD è attribuita allo stato di persistente immunoattivazione [61].

Il primo contributo alla comprensione di questo fenomeno proviene dallo studio SMART in cui, una coorte di pazienti HIV-positivi sono stati suddivisi in due gruppi: uno sottoposto ad una terapia antiretrovirale continua, l'altro sottoposto ad una sospensione della stessa al fine di prevenire i possibili risvolti tossici della terapia sul sistema cardiovascolare. Oltre a presentare una maggior incidenza di AIDS e decessi (motivo per il quale la sperimentazione è stata sospesa) i soggetti del secondo gruppo, sorprendentemente, mostravano un rischio maggiore di eventi cardiovascolari [75]. A questo riscontro, studi successivi condotti a partire dallo stesso lavoro, associavano livelli aumentati di IL-6 e D-dimero [76]: il primo marker aspecifico di infiammazione, il secondo indice di aumentata attività protrombotica, tipica degli stati infiammatori. Questi risultati portano quindi ad ipotizzare che la replicazione virale sostenuta, come quella che tipicamente consegue ad un'interruzione della ART, possa essere responsabile del mantenimento, ad un alto livello, di uno stato infiammatorio cronico che a sua volta sosterrrebbe e promuoverebbe il processo aterosclerotico. L'infiammazione e la disfunzione endoteliale sono infatti eventi cruciali nell'espressione di molecole di adesione (VCAM, ICAM) e nella produzione di IL-6 e TNF-gamma, responsabili della migrazione delle cellule circolanti e di quelle muscolari lisce nello strato subintimale della parete vasale dove si realizza la formazione della placca.

In linea con tale ipotesi, nei pazienti HIV-positivi, aumentati livelli di IL-6, D-dimero e PCR, sono stati associati, in maniera indipendente rispetto ad altri fattori, ad un incremento del rischio cardiovascolare [77] e di mortalità per ogni causa [76].

Un altro importante meccanismo ipotizzato essere uno dei maggiori responsabili dell'infiammazione sistemica nel paziente con infezione da HIV è quello della traslocazione microbica che consegue all'alterata funzione di barriera della mucosa intestinale: la deplezione di linfociti T CD4+ dal tratto gastrointestinale (in particolare Th17) che ha luogo durante tutte le fasi dell'infezione, infatti, potrebbe danneggiare la barriera intestinale, modificare la composizione della flora locale e determinare la traslocazione al circolo periferico, come testimoniato dai livelli misurabili di alcuni componenti microbiche nel plasma di soggetti HIV-positivi, quali il lipopolidesaccaride (LPS) e la flagellina. LPS, riconosciuto dai TLR delle cellule dell'immunità innata alle quali si lega per mezzo di sCD14, sarebbe in grado di attivare le stesse cellule, inducendone l'espressione di geni codificanti per un folto gruppo di citochine infiammatorie (tra cui IL-6 e TNF). La correlazione tra elevati livelli di LPS circolanti e aumentata frequenza di cellule T con fenotipo attivato e la disponibilità di alcuni dati sull'esistenza di un'associazione tra LPS e sCD14 e progressione subclinica dell'aterosclerosi (come valutato con cIMT) suggeriscono un possibile ruolo della traslocazione microbica nell'incremento del rischio cardiovascolare della popolazione HIV positiva, anche in virtù del riscontro, sull'endotelio stressato da stimoli proaterogeni, di recettori TLR-4 che potrebbero essere attivati dal LPS circolante [78].

Nonostante i livelli di IL-6, D-dimero ed altri markers infiammatori siano più elevati in soggetti con infezione non controllata, caratterizzata da viremia sostenuta e linfociti T CD4+ ridotti, una loro alterazione è presente anche in individui HIV-positivi stabilmente soppressi in terapia antiretrovirale e contribuisce a spiegare il loro maggiore rischio cardiovascolare rispetto alla popolazione generale [79]. Merlini et al evidenziano, in una coorte di pazienti in terapia con viremia soppressa, come la presenza di IMT patologica, si associ ad un fenotipo T-cellulare iperattivato e proapoptotico [80]. Se ne deduce quindi che, seppur irrinunciabile nel controllo dell'infezione e nella immunoricostituzione, la terapia antiretrovirale non permette ancora il completo spegnimento dell'infiammazione e

dell'immunoattivazione, oggi ritenuti processi promotori della comorbidità non infettiva nel paziente HIV-positivo.

L'attivazione dei monociti causata da traslocazione microbica aziona il rilascio di CD14 solubile e CD163: il primo è associato ad un aumento della mortalità e il secondo con il rischio di progressione coronarica e aterosclerosi [12,81]. Alti livelli di questi marcatori infiammatori e di fattori di ipercoagulazione (cioè D - dimero, fibrinogeno) sono legate alla coagulazione sistemica e danno infiammatorio cronico dell'endotelio vascolare. Un recente lavoro pubblicato su AIDS sottolinea infatti come sCD14 sia predittivo, in modo indipendente rispetto ad altri fattori, di calcificazione arteriosa coronarica (CAC) e, in presenza di quest'ultima, dell'estensione di aterosclerosi subclinica anche in altri distretti vascolari che in questo studio sono stati indagati attraverso ultrasonografie in multiple sedi [82]. Un marker di attivazione monocito-macrofagica più specifico di infiammazione endoteliale in pazienti HIV positivi appare inoltre sCD163 che Zanni et al, attraverso il ricorso alla FDG-PET, dimostrano associato alla presenza di placca coronarica vulnerabile [83].

Anche l'HIV stesso è considerato responsabile di attivazione immunitaria persistente e disfunzione endoteliale poichè è in grado di penetrare nelle cellule endoteliali attraverso il recettore CD4; inoltre alcune proteine virali di HIV, come gp120 e necrosi tumorale alfa (TNF -  $\alpha$ ), inducono importanti conseguenze sul tono vascolare, sull'adesione e sull'aggregazione delle piastrine attraverso la diminuzione dei livelli di ossido nitrico (NO) nella cellula endoteliale [61]. La viremia residua può essere poi fonte di danni correlati direttamente alla presenza del virus in corso di ART efficace, ma può anche essere collegato al mantenimento del processo di infiammazione cronica e l'attivazione immunitaria persistente [23].

Anche il Cytomegalovirus (CMV) sembra avere un ruolo nell'invecchiamento precoce del sistema cardiovascolare: in un'ampia coorte italiana di pazienti con infezione da HIV la coinfezione da CMV / HIV è stata associata con il rischio di eventi non - AIDS, tra cui gli eventi cardiovascolari, indipendentemente da altri fattori prognostici [84]. Il ruolo potenziale dell'infezione da CMV nei disturbi cardiovascolari potrebbe dipendere dalla complessa interazione tra l'attivazione virale e immunologica, che si conclude con una crescita ciclica, il danno e la riparazione delle cellule endoteliali. In effetti, da un punto di

vista patogenetico, CMV può promuovere la crescita anormale delle cellule endoteliali e la patogenesi dell'aterosclerosi arricchita da fattori pro-angiogenici, tra cui IL-6 [61].

Gli evidenti cambiamenti metabolici riscontrati con l'introduzione della terapia antiretrovirale, hanno portato ad indagare anche il possibile contributo della terapia all'incremento del rischio cardiovascolare nei pazienti HIV positivi. Una tra le più recenti meta-analisi, partendo da una revisione sistematica di studi osservazionali, evidenzia un incremento del rischio di infarto miocardico in soggetti esposti nei 6 mesi precedenti ad abacavir o inibitori delle proteasi, confermando i risultati dello studio D:A:D già citato [85]; dati contrastanti provengono invece da una precedente meta-analisi, basata sulla valutazione di trials randomizzati, che non individuano alcuna relazione tra singole classi farmacologiche, abacavir *in primis*, ed aumento di IMA [86].

Bisogna quindi considerare che nei pazienti affetti da HIV in terapia stabile e con viremia non rilevabile il livello di attivazione del sistema immunitario è drasticamente ridotto rispetto al basale (vale a dire, pre- trattamento), ma raramente torna a livelli normali. Questa attivazione immunitaria è associata con sequele a lungo termine nell'infezione da HIV, come l'aterosclerosi accelerata e diverse altre condizioni che possono modificare la qualità della vita dei soggetti con infezione da HIV. L'obiettivo dei clinici è pertanto cambiato negli ultimi anni: infatti se inizialmente scopo della terapia, era di raggiungere livelli plasmatici non rilevabili HIV, ad oggi, pur rimanendo questo un cardine imprescindibile della terapia antiretrovirale altamente efficace (HAART), non si può non considerare l'invecchiamento precoce cui questi pazienti sono sottoposti e le comorbidity ad esso correlate [61]. Per questo motivo le linee guida nazionali ed internazionali per l'infezione da HIV raccomandano anche lo screening per l'individuazione del paziente ad elevato rischio cardiovascolare [55,87].

### **Pratica clinica**

Per l'individuazione del paziente ad alto rischio cardiovascolare, le ultime linee guida italiane per la gestione clinica del paziente con infezione da HIV prevedono l'individuazione dei classici fattori di rischio quali: età superiore a 50 anni, sesso maschile, familiarità per eventi cardiovascolari giovanili (prima dei 55 anni nei maschi, prima dei 65 nelle femmine), alterazioni del profilo lipidico (colesterolemia totale, HDL, LDL),

dislipidemia familiare, diabete, ipertensione arteriosa, fumo. Questa valutazione generale dovrebbe essere rieseguita annualmente al fine di evidenziare eventuali modifiche del rischio globale e prenderne opportuni provvedimenti [55].

La stima del rischio avviene attraverso algoritmi specifici: il più utilizzato è quello di Framingham che dall'integrazione di dati riguardanti sesso, età, peso, altezza, fumo, diabete, pressione arteriosa, colesterolo totale, HDL ed eventuale presenza di ipertrofia ventricolare sinistra (indagata all'ECG) è in grado di quantificare il rischio di infarto miocardico ed eventi cardiovascolari nei successivi 5 e 10 anni. Questo strumento valutativo, applicabile nei soggetti maschi di età superiore a 50 anni e nelle donne con più di 40 anni [55], mostra una serie di limitazioni nel contesto dell'infezione da HIV in gran parte legate alla sua elaborazione a partire da una popolazione di soggetti americani non HIV-infetti. Ne consegue, di fatto, una sovrastima del rischio cardiovascolare nella popolazione europea da una parte; al contrario, quando ricalibrato per singoli sottogruppi, sottostima il rischio per i pazienti di sesso femminile, diabetici e pregressi fumatori [88]. Queste premesse hanno portato allo studio, nella corte di pazienti D:A:D, di un algoritmo HIV-specifico di predizione del rischio cardiovascolare a 5 anni; tale strumento contempla oltre ai predittori di rischio classici l'esposizione a farmaci antiretrovirali (indinavir, lopinavir ed abacavir) per i quali lo studio D:A:D ha dimostrato influenza negativa sul rischio cardiovascolare [88].

L'American Heart Association propone per la popolazione generale l'algoritmo ASCVD Risk Estimator, in grado di fornire indicazioni utili sull'eventuale ricorso alla terapia con statine [55].

L'ECG e l'Holter pressorio, inoltre, sono indicati per la valutazione del rischio nei pazienti ipertesi, soprattutto quelli in terapia con gli inibitori delle proteasi [55].

Infine in alcuni centri specialistici, sono utilizzati anche test diagnostici per indagare il danno funzionale, come la velocità di polso e l'indice pressorio caviglia-braccio ed il danno strutturale, come lo spessore medio intimale e il calcio coronarico [55].

La gestione del paziente ad elevato rischio mira ad intervenire sugli stili di vita :dieta equilibrata, attività fisica aerobia per almeno 30 minuti 3 volte a settimana, sospensione del fumo di sigaretta [55]. Quest'ultimo, in particolare, assume un'importanza capitale sia in relazione all'elevata prevalenza dell'abitudine tabagica nella popolazione sieropositiva, sia

in virtù della dimostrazione, basata su solidi studi, dell'incrementato rischio cardiovascolare che caratterizza i pazienti HIV-positivi fumatori rispetto ai non o ai pregressi [89]: l'accorciamento medio della vita di un soggetto infetto imputabile al fumo è risultato perfino maggiore di quello attribuibile alla presenza del virus [90].

Per quanto riguarda la terapia antiretrovirale, nei pazienti che iniziano il trattamento con elevato rischio cardiovascolare (Framingham >20% o con malattia cardiovascolare subclinica), l'uso di farmaci, il cui utilizzo è stato associato ad un più elevato rischio di eventi cardiovascolari (Lopinavir/ritonavir, Abacavir), andrebbe riservato a coloro che non hanno alternative; infatti i regimi contenenti atazanavir/ritonavir sono stati associati ad una minor progressione della cIMT rispetto a quelli con darunavir/ritonavir; inoltre schemi terapeutici contenenti gli inibitori delle integrasi sono quelle con minor impatto sull'assetto lipidico [55]

Per i pazienti ad alto rischio che siano già in terapia, invece, lo switch verso farmaci con minore tossicità lipidica e/o glucidica rappresenta una possibile strategia preventiva mirata alla riduzione dei classici fattori di rischio cardiovascolare ma, requisito fondamentale perché si possa optare per questa scelta, è l'efficacia virologica anche del secondo regime. Esempi di tali interventi sono rappresentati dalla sostituzione di un PI boosterato con rotonavir con un PI meno tossico sul piano metabolico, con un Inibitore delle integrasi quale raltegravir (in quest'ultimo caso è stata dimostrata anche una riduzione dei marcatori solubili di infiammazione) [55].

Bisogna poi considerare le terapie mirate a controllare i fattori di rischio cardiovascolari classico, cioè ipertensione, diabete e dislipidemia: i principi di trattamento di queste condizioni morbose sono analoghi a quelli della popolazione generale e devono tenere in attenta considerazione l'età del soggetto, le potenziali interazioni farmacologiche con i farmaci antiretrovirali, la necessità di un intervento più aggressivo per raggiungere i livelli soglia individuati; infatti l'intervento su più fattori di rischio contemporaneamente ha un effetto moltiplicativo sulla riduzione del rischio cardiovascolare globale.

Analogamente alla popolazione generale, anche nei pazienti con infezione da HIV, le statine, inibitori della HMG co-A reduttasi, che sono in grado di ridurre la mortalità cardiovascolare e globale attraverso il miglioramento dell'assetto lipidico, l'attenuazione dello stato infiammatorio (come dimostrato dalla diminuzione, in soggetti in cART, dei



relativi markers solubili) e la riduzione del grado di attivazione immunitaria nei pazienti naive [91,92].

Il principale problema legato all'uso delle statine è la loro possibilità di interazione con alcune delle componenti della cART: simvastatina, lovastatina ed atorvastatina, per esempio, sono metabolizzate dello stesso citocromo P450 3A4 epatico di Efavirenz e PI, così come fluvastatina e, in misura molto minore rosuvastatina, utilizzano lo stesso P450 2C9 dei PI. Pravastatina pertanto, essendo degradata da sistemi enzimatici differenti rispetto al P450, rappresenta la statina di prima scelta nei pazienti HIV-positivi [93].

Il riscontro di una non completa normalizzazione dei markers solubili di infiammazione e di quelli di immunoattivazione in soggetti HIV-positivi in terapia stabilmente soppressi, ha portato ad ipotizzare che il ricorso a farmaci in grado di contrastare questi fenomeni residui, quali le statine e l'aspirina, potesse contribuire alla riduzione del rischio cardiovascolare. Lo studio JUPITER ha dimostrato come l'uso di rosuvastatina in pazienti sieronegativi con valori di LDL normali, diminuisce i livelli di PCR e l'incidenza di eventi cardiovascolari [61, 94] mentre l'aspirina, utilizzata per la prevenzione primaria e secondaria dell'IMA nella popolazione generale, si è dimostrata efficace nei soggetti HIV-infetti nel ridurre l'attivazione piastrinica ed immunitaria [95]. Nonostante ciò le evidenze scientifiche a disposizione non sono ancora così complete e forti da giustificare un uso nella coorte di soggetti HIV-positiva che differisca da quello per il quale tali farmaci sono indicati nella popolazione generale.

In considerazione del loro effetto pleiotropo sul livello di infiammazione, l'infezione da HIV può essere considerata una indicazione allargata il cui beneficio va bilanciato rispetto ai rischi potenziali di tossicità a lungo termine, ai rischi legati all'uso di farmaci contemporaneamente e alle interazioni farmacologiche con in farmaci antiretrovirali.

### **3.3 Calcificazione Aortica Addominale (AAC)**

#### **Definizioni ed epidemiologia generali**

L'osteoporosi e le malattie cardiovascolari sono due principali problemi di salute pubblica. Entrambi sono associati ad alta morbosità, ospedalizzazione a lungo termine, mortalità e perdita di autosufficienza che porta ad ospedalizzazione [96]. Pertanto, essi sono associati

con costi di bilancio elevati di salute. Molti studi dimostrano che le fratture osteoporotiche sono associate a più alto rischio di eventi cardiovascolari.

Dati derivati da una sperimentazione farmaceutica di un ampio gruppo di donne in post-menopausa, che avevano avuto almeno una grave frattura vertebrale (grado 3 secondo la scala semiquantitativa di Genant) hanno dimostrato un rischio di eventi cardiovascolari maggiori (ad esempio infarto miocardico, ictus, morte improvvisa del miocardio) quattro volte più alto rispetto ad un gruppo di donne senza fratture vertebrali [97,98].

In un ampio studio condotto a Taiwan, la frattura vertebrale osteoporotica è stata associata ad un più alto rischio di ictus, mentre la frattura dell'anca è risultata associata ad più alto rischio di infarto miocardico [99,100]. D'altra parte, gli individui con malattie cardiovascolari hanno un rischio maggiore di fratture osteoporotiche maggiori, ad esempio dell'anca o fratture vertebrali, come dimostrato in un'ampia coorte svedese in cui la cardiopatia ischemica è stata associata con un più alto rischio di frattura dell'anca [101].

Inoltre, diversi studi dimostrano che l'insufficienza cardiaca è anche associata a più elevato rischio di frattura dell'anca [102,103].

### **Eziopatogenesi, diagnosi e studi clinici della calcificazione aortica addominale nella popolazione generale**

La calcificazione arteriosa è un marcatore di malattia cardiovascolare ed è stato dimostrato come la calcificazione aortica addominale (AAC) sia fortemente associata con l'arteriosclerosi generalizzata e sia predittiva di incidenza di malattie cardiovascolari e di mortalità indipendentemente da altri fattori di rischio nella popolazione immunocompetente [104,105]; inoltre una grave AAC è associata ad una bassa densità minerale ossea e ad una superiore fragilità ossea, come dimostrato da studi condotti soprattutto nella popolazione femminile e nelle coorti miste di pazienti immunocompetenti [106-109].

La calcificazione vascolare è stata considerata un processo di invecchiamento passivo età correlato, senza significato biologico. Tuttavia, studi più recenti hanno dimostrato che la calcificazione vascolare è un processo altamente regolato [31, 110]. Si tratta di fattori genetici, ormoni, citochine, enzimi coinvolti nel metabolismo e trasporto di calcio e fosfato con alla base un processo di transdifferenziazione di cellule muscolari lisce vascolari in cellule osteoblastiche. Tale processo determina un'attiva deposizione di idrossiapatite da

parte di cellule simil-osteoblastiche, esprimenti un elevato numero di proteine ossee (osteocalcina, fosfatasi alcalina, core binding factor alfa 1) e derivanti dalla transdifferenziazione di cellule muscolari lisce (VSCM) della tonaca media, indotta da un ampio spettro di stimoli differenti (iperfosfatemia, iperglicemia, iperlipidemia, citochine infiammatorie, stress ossidativo, micro-RNA, farmaci ecc) [31].

Dal punto di vista eziopatogenetico, quindi, l'AAC rappresenta una localizzazione distrettuale del più generale processo di calcificazione vascolare definito dalla deposizione ectopica di sostanza minerale nelle pareti delle grosse arterie quali aorta, coronarie, carotidi, ileofemorali o nelle valvole cardiache. Il processo di mineralizzazione ectopica dal quale origina la calcificazione aortica addominale coinvolge in maniera omogenea la tonaca media arteriosa e si inserisce in quel quadro di arteriosclerosi (o Mönckeberg disease) che si differenzia dalla calcificazione focale delle placche aterosclerotiche dell'intima sia per fattori di rischio che per meccanismi molecolari, conseguenze e complicazioni [31].

Uno dei principali caratteri della AAC è rappresentato da un irrigidimento delle pareti vasali e perdita della loro elasticità con importanti conseguenze emodinamiche sia in fase sistolica quando, per la ridotta distensibilità aortica, si realizza una redistribuzione maggiore del flusso sanguigno ai distretti corporei superiori, sia durante la diastole quando il mancato ritorno elastico del vaso impedisce una corretta perfusione coronarica: nel primo caso si assiste ad un aumento del rischio di stroke cerebrali mentre nel secondo di cardiopatia ischemia [110].

Il riscontro di patterns d'espressione fenotipica tipici di cellule ossee a livello vascolare, è spesso associato alla contestuale identificazione di un metabolismo osseo alterato con vari gradi di riduzione dei valori della BMD fino ad una osteoporosi conclamata: questa contraddittoria associazione, conosciuta con il nome di "calcification paradox", è frequente non solo in soggetti osteoporotici, con patologia renale e con patologie ossee, ma anche nella popolazione sana [31].

Nonostante l'esatto meccanismo alla base della paradossale associazione tra AAC ed osteoporosi non sia ancora stato perfettamente delineato, si ritiene che un evento unificatore di entrambi i processi possa essere indentificato in una disfunzione del sistema RANK-RANKL-OPG ed in una differente risposta allo stesso da parte del tessuto osseo e vascolare: infatti l'aumentata espressione di RANKL, in particolare, è in grado da una parte di

incrementare il riassorbimento osseo e, dall'altra, di indurre la transdifferenziazione delle VSMC in cellule ossee determinando la deposizione minerale a livello vascolare [111,112]. Contestualmente l'OPG, neutralizzando RANKL ed impedendone l'attivazione di RANK, sembra avere effetto protettivo sia nei confronti del riassorbimento osseo che della calcificazione vascolare, come dimostrato dal riscontro di entrambi i fenomeni in topi knockout per il gene OPG [113].

Dal punto di vista diagnostico, bisogna poi considerare che la valutazione di AAC è facilmente disponibile, poco costosa e facile da eseguire. AAC è valutata infatti attraverso radiografie laterali della colonna lombare che abbiano cura di includere anteriormente uno spazio sufficiente alla valutazione del prospiciente tratto di aorta; la severità della calcificazione è espressa attraverso un sistema di score semiquantitativo a 24 punti (messo a punto da Kauppila et al) o 8 punti (versione semplificata), in cui il punteggio è attribuito in relazione al coinvolgimento della parete anteriore e posteriore dei 4 segmenti aortici corrispondenti alle prime 4 vertebre lombari [114, 115,116]. Inoltre AAC può essere valutato dalla scansione laterale della colonna vertebrale ottenuta dalla DEXA) utilizzando i punteggi di cui sopra e utilizzando la tomografia computerizzata quantitativa che, pur essendo più accurata di RX e DXA nella quantificazione della calcificazione, è tuttavia abitualmente poco usata per la sua minor disponibilità, il suo maggior costo e la maggior dose d'irradiazione del paziente [117].

Diversi studi hanno dimostrato come la AAC di tipo severo sia predittiva sia di patologie cardiovascolari [105] che di mortalità cardiovascolare [104] e rimane tale anche dopo correzione per i classici fattori confondenti quali età, fumo, pressione arteriosa, diabete e dislipidemia.

Altrettanto importante è la correlazione tra AAC e fratture da fragilità, ampiamente indagata sia da studi trasversali che prospettici, nei quali si evidenzia come una AAC di tipo severo si associ ad un maggior rischio di fratture vertebrali, anche dopo correzione per età, BMD ed altri fattori confondenti [106, 107, 109]. Tale rischio riguarda la popolazione maschile [106] e femminile [107] ed è maggiore per fratture severe rispetto a quelle di grado moderato e per fratture multiple piuttosto che singole [107, 109].

Gli ultimi dati, di Szulc P et al [118] riguardano uno studio caso controllo condotto in donne anziane, in cui una grave AAC è stata associata con un più alto rischio a breve termine di

fratture vertebrali e dell'anca, durante i 4 anni di follow-up, dopo aggiustamento per fattori confondenti (età, indice di massa corporea, il fumo, la densità minerale ossea dell'anca, la pressione sanguigna sistolica, terapia ormonale sostitutiva) (OR = 2.31, 95% CI: 1,24-4,30,  $p < 0,01$ ) ma non con il rischio a lungo termine di queste fratture. Non è stata dimostrata alcuna associazione tra AAC e rischio di altre fratture in questa stessa popolazione.

Un'analoga correlazione non è tuttavia stata dimostrata per AAC di grado moderato o lieve, suggerendo una loro scarsa predittività per fratture da fragilità [119].

Più controversa è invece l'associazione tra AAC e ridotta BMD poiché la relazione tra questi parametri è fortemente dipendente dalla severità della AAC, dall'età media della coorte dei soggetti valutati e dalla presenza di fattori confondenti; in particolare, negli studi comparativi di AAC di tipo lieve o moderato con controlli negativi, l'evidenza di un maggior rischio di osteopenia/osteoporosi nel primo gruppo rispetto al secondo, scompare quando i risultati siano corretti per l'età [120], mentre nel confronto tra soggetti con AAC severa versus AAC moderata/lieve, il rischio di riduzione della BMD si mantiene più elevato tra i primi anche dopo l'adattamento per l'età [108]. Ne deriva quindi che l'associazione tra AAC e rischio di fratture è indipendente dal valore della BMD nonostante sia la calcificazione che la riduzione della massa ossea contribuiscano ad elevare tale rischio [108].

### **Calcificazione aortica addominale nella popolazione con infezione da HIV**

Un numero consistente di studi ha mostrato una significativa associazione reciproca tra più un alto rischio di grave frattura da osteoporosi e un più alto rischio di evento cardiovascolare; inoltre, una grave AAC è stata associata con un rischio elevato di grave frattura osteoporotica dopo aggiustamento per fattori confondenti quali età, BMD e cadute precedenti. Tuttavia, gli studi disponibili si sono focalizzati sulla conferma dell'esistenza o meno di questa associazione in varie popolazioni e la sua indipendenza di fattori confondenti. Al contrario, non è chiaro se la valutazione di AAC possa migliorare la previsione di fratture osteoporotiche e l'identificazione degli individui ad alto rischio di fratture osteoporotiche nella pratica clinica, come ad esempio nei pazienti con infezione da HIV [96].

Ad oggi l'unico dato in questa tipologia di malati è quello presentato dal nostro gruppo di studio, che ha indagato la prevalenza della AAC e la sua correlazione con fratture vertebrali

e BMD nella popolazione HIV-positiva, e ha mostrato come la calcificazione dell'aorta addominale sia predittiva di ridotta massa ossea e di fratture vertebrali; in particolare, la AAC risulta più frequente nei soggetti con infezione da HIV più anziani e con malattia più avanzata ed i pazienti con calcificazione aortica addominale presentano una maggiore incidenza di comorbidità cardiovascolare, renale e di fratture vertebrali la cui severità è direttamente correlata a quella della AAC [121].

## **RAZIONALE E SCOPO DELLO STUDIO**

L'osteoporosi e le malattie cardiovascolari sono problemi di salute pubblica. Le fratture da fragilità sono associate ad un alto rischio di eventi cardiovascolari ed i pazienti con malattie cardiovascolari hanno un maggiore rischio di fratture. La calcificazione dell'aorta addominale (AAC) di grado severo è associata a più alta mortalità e morbosità cardiovascolare e ad un più elevato rischio di fratture in coorti miste di pazienti immunocompetenti. In numerosi studi trasversali la AAC di grado severo è stata associata ad una maggiore prevalenza, ad un numero più elevato e ad una maggiore severità delle fratture vertebrali dopo aggiustamento per fattori confondenti, tra cui la densità minerale ossea (BMD), in entrambi i sessi. I dati relativi al collegamento tra AAC e BMD sono discordanti. L'età, il fumo, l'ipertensione, il diabete mellito, il basso grado di infiammazione sistemica sono possibili fattori di rischio di AAC di grado severo e rischio di fratture. Tuttavia, negli studi clinici dei soggetti HIV negativi, il legame tra AAC e fratture è risultato significativa dopo aggiustamento per questi fattori [96].

Ad oggi non esistono studi sull'impiego della AAC nella popolazione HIV positiva per la quale un adeguato indicatore di rischio cardiovascolare ed osseo potrebbe essere d'aiuto nell'individuare i soggetti più vulnerabili allo sviluppo di queste comorbidità, in maniera verosimilmente più precisa rispetto a quella dei classici algoritmi (Framingham, FRAX) mutuati dalla popolazione generale [55].

Sulla base di queste premesse, l'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare la presenza e la distribuzione di calcificazione aortica addominale in una coorte di pazienti con infezione da HIV e la sua correlazione con la patologia cardiovascolare e la patologia ossea, identificando i fattori clinici ed immunologici associati alla presenza di AAC.

## MATERIALI E METODI

### 1. Popolazione in studio

280 pazienti asintomatici con infezione da HIV sono stati consecutivamente arruolati presso gli ambulatori della Clinica di Malattie Infettive e Tropicali dell'ASST Santi Paolo e Carlo, Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia per lo screening delle comorbidità cardiovascolare ed ossea.

Per tutti i pazienti sono stati raccolti i dati relativi alle caratteristiche demografiche (etnia, sesso, età), all'infezione da HIV (conta e nadir dei linfociti T CD4+, diagnosi di AIDS, tipo di regime cART, durata della terapia, co-infezione da virus HCV) ed ai classici fattori di rischio cardiovascolare ed osseo (fumo, alcool, menopausa, pregresse fratture da fragilità, terapie steroidee).

Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato, approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale San Paolo, per la raccolta di campioni di sangue periferico e per la criopreservazione di plasma e cellule mononucleate.

### 2. Esami di laboratorio

Nell'ambito dello screening delle comorbidità non infettive sono stati raccolti campioni di sangue periferico e di urine per ciascun paziente per indagini laboratoristiche quali: esami ematochimici (funzionalità epatica e renale, glicemia e insulinemia, profilo lipidico), dosaggio della vitamina D, dosaggio dei markers di riassorbimento osseo (telo peptide, paratormone [PTH]), dosaggio della creatinemia per la stima del filtrato glomerulare.

Per ciascun paziente abbiamo calcolato i seguenti indici, che permettono una più attenta valutazione clinica:

- Body mass Index (BMI), indice di massa corporea:  $\text{peso (Kg)} / \text{altezza (m)}^2$ ;
- Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR):  $\text{glicemia a digiuno (mg/dL)} \times \text{insulinemia a digiuno (mU/mL)} / 405$ , indicativo della presenza di insulino-resistenza per valori  $> 2.6$ ;
- Modification of Diet in Renal Disease (MDRD): GFR, volume del filtrato glomerulare  $(\text{mL}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2) = 175 \times (\text{Creatinina sierica})^{-1.154} \times (\text{età})^{-0.203} \times (0.742 \text{ se donna}) \times (1.212 \text{ se Afro-Americano})$ , di ausilio per la stima del filtrato



glomerulare, così come la formula di Cockcroft Gault:  $GFR$ , volume del filtrato glomerulare (mL/min) =  $0,85$  (solo se donna)  $\times$  (140 - età)  $\times$  (peso kg) / 72  $\times$  creatininemia mg/100 mL;

- algoritmo di Framingham: disponibile sul sito [hivpv.org/Home/Tools.aspx](http://hivpv.org/Home/Tools.aspx), che stima il rischio di infarto miocardico ed eventi cardiovascolari a 10 anni;
- algoritmo FRAX®: tool disponibile sul sito “[www.shef.ac.uk/FRAX/tool.jsp](http://www.shef.ac.uk/FRAX/tool.jsp)”, che indica il rischio di fratture osteoporotiche maggiori a 10 anni.

### 3. Esami strumentali

I pazienti in studio sono stati sottoposti ai seguenti esami strumentali:

- **Radiografia della colonna vertebrale in proiezione latero-laterale (RX)**

La ricerca di deformità vertebrali e di AAC è stata condotta utilizzando uno stesso radiogramma latero-laterale della colonna vertebrale dorso-lombare; questa scelta consegue alla dimostrazione della possibilità di valutare la AAC, con un buon grado di sensibilità e specificità, sulla stessa RX eseguita per lo studio morfometrico della colonna vertebrale.

La ricerca di deformità vertebrali è stata effettuata attraverso esame morfometrico manuale di un RX della colonna vertebrale in proiezione latero-laterale, mentre la loro severità è stata definita con metodo semiquantitativo secondo Genant [98], utilizzando il sistema di scoring SQ (visual semiquantitative). L’assegnazione del punteggio SQ rispetta i seguenti criteri: 0 per vertebre normali; 1 per vertebre con deformità lieve (definita da una riduzione di altezza del soma vertebrale < 25%); 2 per vertebre con deformità moderata (definita da una riduzione di altezza del soma vertebrale compresa tra il 26% ed il 40%); 3 per vertebre con deformità grave (definita da una riduzione di altezza del soma vertebrale > 40%). Lo SDI (spine deformity index) è ottenuto sommando il punteggio SQ assegnato ad ogni vertebra. Le fratture vertebrali sono state definite per valori di  $SDI \geq 1$ .

Lo studio della AAC è stato effettuato, con un approccio semiquantitativo, valutando sull’Rx latero-laterale della colonna lombare la presenza (aree o linee di radiopacità) e l’estensione totale delle calcificazioni a carico della parete anteriore e posteriore del tratto di aorta prospiciente i somi vertebrali da L1 a L4, utilizzando il sistema di score ad 8 punti ideato da Schousboe et al. [116] a partire da quello a 24 punti di Kauppila et al [114].

Alla somma delle calcificazioni rilevabili su ciascuna delle due pareti analizzate è stato assegnato un punteggio pari a: 0, se non presenti calcificazioni; 1, se la lunghezza della calcificazione è uguale o inferiore all'altezza di un soma vertebrale; 2, se l'estensione della calcificazione va da poco più dell'altezza di una vertebra fino a quella di due; 3, quando la calcificazione ha un'altezza maggiore a quella di due vertebre o uguale a quella di tre; 4, se la lunghezza totale delle calcificazioni è superiore all'altezza di tre somi vertebrali. Sommando il punteggio assegnato alle calcificazioni della parete anteriore con quello derivante dalla posteriore, si ottiene quindi uno score finale che può variare da un minimo di 0 ad un massimo di 8 punti.

La definizione della severità della calcificazione è stata stabilita nel seguente modo: severa/moderata se  $AAC > 2$ .

- **Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) lombare e femorale**

La BMD è stata misurata, per ciascun paziente, a livello della colonna lombare e del collo femorale sinistro con apparecchiatura Hologic QRD 4500 Elite (Hologic Inc, Waltham, MA, USA) o Lunar Prodigy e tecnologia "fan beam". I valori densitometrici sono stati interpretati in accordo con i criteri di refertazione della ISCD (International Society for Clinical Densitometry) i quali prevedono che:

- per donne in post-menopausa e uomini di età  $> 50$  anni si utilizzi il T-score facendo riferimento ai criteri WHO. Questi ultimi definiscono l'osteopenia per  $T\text{-score} < -1$  e  $> -2.5$ , l'osteoporosi per  $T\text{-score} \leq -2.5$  e l'osteoporosi grave per  $T\text{-score} \leq -2.5$  in presenza di fratture da fragilità;
- per donne in pre-menopausa e uomini di età  $< 50$  anni si utilizzi lo Z-score definendo l'osteopenia per valori  $< -1$  e l'osteoporosi per valori  $< -2$ .

- **Ultrasonorografia delle arterie carotidee**

L'ispessimento medio-intimale delle arterie carotidee (carotid Intima Media Thickness, cIMT) è stato valutato attraverso l'ultrasonorografia B-mode utilizzando sonde ecografiche ESAOTE da 7 a 14 MZ; per ciascun lato è stato misurato lo spessore di 3 diversi punti della carotide interna: il bulbo, la biforcazione ed il primo cm dopo la biforcazione. La IMT finale è stata calcolata come media dei 3 differenti valori ed è stata definita normale (nIMT)

quando <1mm e patologica (pIMT) quando >1mm. Quest'ultima, a sua volta, è stata classificata come increased-IMT (iIMT) per valori >1mm ma <1.5 mm e come placca carotidea quando >1.5 mm.

#### **4. Esperimenti di laboratorio**

##### **Definizione del fenotipo T-cellulare per mezzo di citometria a flusso**

La valutazione del fenotipo T-cellulare è stata eseguita attraverso studio citofluorimetrico di campioni di sangue fresco intero, previa lisi dei globuli rossi ed aggiunta di anticorpi marcati con fluorocromi.

In particolare sono stati utilizzati i seguenti anticorpi fluorocromati:

- CD4-Pcy7 (BD Bioscience, Milano, Italia)
- CD8-Pcy5 (BD Bioscience, Milano, Italia)
- CD38-FITC (BD Bioscience, Milano, Italia)
- CD45RA-APC (BD Bioscience, Milano, Italia)
- CD45R0-PE (BD Bioscience, Milano, Italia)
- CD127-PE (BD Bioscience, Milano, Italia)
- CD95-FITC (BD Bioscience, Milano, Italia)

Le seguenti combinazioni di anticorpi sono state impiegate per lo studio di parametri di omeostasi e attivazione CD4 e CD8 T-linfocitaria:

- cellule naive: CD4/CD8/CD45RA
- cellule “central memory”: CD4/CD8/CD127
- cellule di memoria: CD4/CD8 CD45R0
- cellule attivate: CD8/CD38
- cellule di memoria attivate: CD8/CD38/CD45R0
- cellule apoptiche: CD4/CD8/CD95

I marcatori espressi sono stati identificati mediante citofluorimetria eseguita con FACSVerse (BD Bioscience).

##### **Valutazione dei precursori osteoclastici per mezzo di citometria a flusso**

La determinazione dei precursori osteoclastici è stata eseguita su un sottogruppo di 54 pazienti tutti stabilmente in terapia antiretrovirale così distribuiti:

- 22 pazienti con AAC e con BMD ridotto (osteopenia o osteoporosi)
- 12 pazienti con AAC e con BMD normale
- 10 pazienti senza AAC e con BMD ridotto (osteopenia o osteoporosi)
- 10 pazienti senza AAC e con BMD normale

Per tali esperimenti sono state utilizzate cellule mononucleate del sangue periferico (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), precedentemente separate da sangue intero per mezzo di tecnica Ficoll-Paque (Biocoll separating solution, BIOSPA) e criopreservate.

I PBMCs sono stati marcati con i seguenti anticorpi:

- CD14-PCy7 e CD11b-PE (BD Bioscience, Milano, Italia) per l'identificazione di cellule della linea monocito/macrofagica;
- CD51/61-FITC (BD Bioscience, Milano, Italia) per l'identificazione di integrine espresse ad alti livelli dagli osteoclasti.

La contemporanea espressione di tali molecole permette di identificare i precursori osteoclastici (osteoclastic precursors, OCP).

I marcatori espressi sono stati identificati mediante citofluorimetria eseguita con FACSVerse (BD bioscience); il software FlowJo è stato utilizzato come programma di analisi.

## **5. Analisi statistiche**

Nelle analisi statistiche univariate, per lo studio comparativo di variabili categoriche (esprese in percentuale) è stato utilizzato il Test del Chi Quadrato di Pearson, mentre per il confronto di variabili continue (esprese come mediana dei valori in esame e IQR - interquartile range -) è stato impiegato il Test di Wilcoxon.

Nelle analisi statistiche multivariate per il calcolo dell'OR (Odds Ratio) ci si è avvalsi di un modello di regressione logistica univariata mentre per quello dell'AOR (Adjusted Odds Ratio) è stata utilizzata una regressione logistica multivarita.

La relazione tra severità della AAC e SDI è stata valutata con la correlazione di Spearman.

In tutti i casi la soglia di significatività statistica è stata fissata a  $p$  (p-value)  $\leq 0.05$ .

La rappresentazione grafica dei risultati è stata ottenuta con software Graph Pad Prism 6.

## RISULTATI

### 1. Caratteristiche della popolazione in studio

Nell'ambito del seguente studio sono stati arruolati 280 pazienti HIV+ asintomatici: 205/280 pazienti (73.2%) erano in terapia antiretrovirale stabilmente soppressiva.

215/280 pazienti con infezione da HIV (76.8%) non presentava AAC (AAC-: punteggio =0 all'AAC-8 score) e 65/280 (23.2%) presentava AAC (AAC+: punteggio  $\geq 1$  all'AAC-8 score).

Dei 65 pazienti con AAC, 13 presentavano una forma moderata/severa definita da un punteggio all'AAC-8 score  $> 2$ .

Una ridotta BMD (T-score o Z-score  $< -1$ ) è stata riscontrata in 163/280 pazienti (58.2%) mentre la presenza di fratture vertebrali (FV), definita da uno SDI  $\geq 1$ , in 47/274 (17,1%) soggetti.

### 2. Fattori demografici e comorbidità associate alla calcificazione aortica addominale

Le caratteristiche demografiche ed HIV-relate dei pazienti in studio (215 AAC- e 65 AAC+) sono riportate in Tabella 1.

Tra i pazienti arruolati l'età mediana era di 43 anni (IQR 46-48) per quelli AAC- e di 55 (IQR 49-64) per quelli AAC+. Le donne rappresentavano il 29.7% nel gruppo negativo per AAC e solo il 20% nel gruppo AAC+. La mediana del BMI era di 24.2 (IQR 22.2-26.4) per i pazienti AAC- e di 24.9 (IQR 23.1-27.9) per quelli AAC+.

Al momento del reclutamento, la conta dei CD4+ era rappresentata da una mediana di 475 (IQR 370-618) e di 490 (IQR 326-715) cellule/mm<sup>3</sup> rispettivamente per i pazienti AAC- ed AAC+; la mediana del rapporto CD4/CD8 era di 0.56 (IQR 0.37-0.82) nel gruppo AAC- e di 0.55 (0.42-0.77) per i pazienti AAC+. La mediana degli anni trascorsi dalla diagnosi di infezione da HIV era di 10 (IQR 5-20) e di 9.5 (IQR 5-21.5) rispettivamente per i pazienti AAC- ed AAC+; il 16.8% dei primi, inoltre, aveva ricevuto una diagnosi di AIDS rispetto al 30.2% del secondo gruppo; la mediana del nadir di linfociti T CD4+ era di 277 (IQR 165-419) nel gruppo negativo per AAC e 165 (IQR 69-354) per quello positivo per AAC. Inoltre, nel primo gruppo il 69% dei pazienti (149/215) era in terapia stabilmente soppressiva; nel secondo gruppo l'86% dei pazienti (56/65) era in terapia stabilmente

Le principali comorbidità dei 215 soggetti AAC- e dei 65 pazienti AAC+ sono riportate in Tabella 1.

Il fumo era presente quale fattore di rischio cardiovascolare nel 50 % dei pazienti AAC- e nel 63% di quelli AAC+. Il 4.1% dei pazienti senza calcificazione aortica addominale si presentava come iperteso rispetto al 13.8% nel gruppo con AAC+. L'insulino-resistenza e il diabete erano presenti, rispettivamente, nel 35% e nel 9% dei pazienti AAC- e nel 44.6% e 17% di quelli AAC+. La positività per ispessimento della cIMT o placca carotidea era pari al 42.3% nel gruppo senza calcificazione e nel 78.4% nel gruppo con calcificazione.

L' 1.8% dei pazienti negativi per AAC e il 7.6% di quelli positivi aveva inoltre un  $GFR < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ .

Una riduzione della BMD (T-score o Z-score  $< -1$ ) era riscontrabile nel 60.2% dei pazienti AAC- e nel 75% dei pazienti AAC+ mentre la presenza di fratture vertebrali ( $SDI \geq 1$ ) era osservabile, rispettivamente, nel 14.3% e nel 26.5% dei due gruppi.

All'analisi univariata le seguenti variabili hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra pazienti AAC- ed AAC+ (Tabella 2); l'età (ogni 10 anni in più): OR 3.81 (IC 95% 2.64-5.51)  $p < .001$ ; il BMI (ogni punto in più): OR 1.07 (IC 95% 1.00-1.14)  $p = .02$ ; il Nadir delle cellule TCD4+: OR 0.89 (IC 95% 0.82-0.97)  $p = .01$ ; gli anni di diagnosi di AIDS: OR 2.13 (IC 95% 1.11-4.08)  $p = .02$ ; essere in terapia Haart (vs naive): OR 2.75 (IC 95% 1.28-5.90)  $p = .009$ .

Per quanto riguarda le comorbidity, come dimostrato sempre nella tabella 2, oltre alla ben nota associazione tra AAC e patologia cardiovascolare (ipertensione: OR 3.67 (IC 95% 1.39-9.07)  $p = .008$ ; aumento cIMT o placca: OR 4.96 (IC 95% 2.59-9.50)  $p < .001$ ) nella nostra analisi sono risultati associati in maniera statisticamente significativa ad AAC la riduzione del GFR al di sotto di  $60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ : OR 4.39 (IC 95% 1.14-16.88)  $p = 0.03$ ; la riduzione della densità minerale ossea: OR 2.45 (IC 95% 1.32-4.54)  $p = 0.042$  e la presenza di fratture vertebrali ( $SDI \geq 1$ ) OR 2.17 (IC 95% 1.10-4.16)  $p = 0.02$ .

L'analisi multivariata per lo studio dei fattori indipendentemente associati alla presenza di AAC nella nostra casistica ha mostrato che solo l'età e la presenza di ispessimento della cIMT o di placca carotidea sono risultate significativamente associate alla presenza di calcificazione aortica addominale ( $p < .0001$  e  $p = 0.01$ , rispettivamente); rimane comunque una blanda associazione con la patologia ossea (BMD:  $p = 0.05$ ) (Tabella 2).

In particolare l'AOR (Adjusted Odd Ratio) per AAC dei soggetti più anziani, appare di 2.78 per ogni 10 anni di incremento d'età (con IC 95%1.78-4.34), mentre l'AOR per AAC in presenza di ispessimento di cIMT o placca carotidea risulta pari a 2.8 (IC 95% 1.22-6.41).

### **3. Fattori indipendentemente associati a fratture vertebrali nella popolazione in studio**

Dal momento che l'analisi univariata ha evidenziato un'associazione tra AAC e fratture vertebrali (FV) e dato che la stessa correlazione è stata ben documentata in numerosi studi di letteratura condotti in differenti popolazioni HIV-negative [104, 107-109], abbiamo ricercato i possibili fattori associati a fratture vertebrali nella popolazione in studio.

L'analisi di regressione logistica multivariata utilizzata ha incluso l'esistenza di associazione tra FV, definite come  $SDI \geq 1$ , ed una serie di condizioni quali: sesso femminile, AAC, BMD ridotto, incremento dei markers di turnover osseo, carenza di vitamina D ed aumentati livelli di PTH circolanti. La AAC è risultata associata a FV in maniera indipendente rispetto ai valori di BMD ed ai livelli di vitamina D, markers di turnover osseo e PTH circolanti ( $p=0.01$ ) (Modello1, Tabella 3). Tale associazione viene persa quando si inserisce ulteriormente nel modello l'età (Modello 2, Tabella 3); in questa seconda analisi, infatti, il rischio rimane aumentato ma perde di significatività ( $p=0.06$ ).

Abbiamo inoltre valutato la relazione tra entità della AAC, quantificata con l'AAC-8 score, e fratture vertebrali, definite da uno  $SDI \geq 1$ , attraverso la correlazione lineare di Spearman dalla quale è emerso che la severità della AAC è direttamente correlabile con la presenza e con il grado di FV ( $SDI \geq 1$ ) ( $\rho=0.16$ ;  $p=0.02$ ) (Figura 1).

### **4. Fenotipi T-cellulari associati alla presenza di calcificazione aortica addominale**

Per quanto riguarda i parametri di omeostasi T linfocitaria non sono emerse differenze statisticamente significative tra pazienti AAC- ed AAC+ per: linfociti T-CD4+ naive (Figura 2 A, B), di memoria centrale (Figura 2 C, D) ed apoptotici (Figura 2 E, F); linfociti T-CD8+ naive (Figura 3 A, B), di memoria centrale (valori percentuali; Figura 3 C), attivati (Figura 4 A, B), attivati/di memoria (Figura 4 C, D) ed apoptotici (Figura 4 E, F).

Gli unici immunofenotipi associati ad AAC sono risultati i seguenti: CD8+CD127+ indicativi di cellule di memoria centrale (valori assoluti: AAC-: 377 cellule/mmc, IQR 264-

540; AAC+: 434 cellule/mmc, IQR 336-698;  $p=0.007$ ; Figura 3 D) e CD8+CD45R0+ caratterizzanti i linfociti T di memoria (valori percentuali: AAC-: 11%, IQR 8-18; AAC+: 16.5%, IQR 9-21;  $p=0.04$ ; Figura 3 E; valori assoluti: AAC-: 204 cells/mmc, IQR 130-320; AAC+: 269 cells/mmc, IQR 167-444;  $p=0.01$ ; Figura 3 F).

## **5. Livelli di precursori osteoclastici circolanti nella popolazione in studio**

Poiché AAC sembra essere predittiva di fratture vertebrali, abbiamo cercato di comprendere i possibili meccanismi patogenetici alla base di questa associazione. Mediante tecnica citofluorimetrica, sono stati studiati i livelli di precursori osteoclastici (OCP) circolanti in un sottogruppo di pazienti.

I livelli di OCP circolanti sono risultati significativamente più elevati ( $p=0.0025$ ) in pazienti con AAC e BMD ridotto (mediana 1.8%, IQR 1.3-2.75) rispetto a soggetti con AAC e BMD normale (mediana 1.09%; IQR 0.98-1.34) ( $p=0.003$ ) ed a individui senza AAC e con BMD ridotto (mediana 1.225%; IQR 1.06-1.34) ( $p=0.0017$ ) (Figura 5).



## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La calcificazione dell'aorta addominale (AAC) di grado severo è associata a più alta mortalità e morbosità cardiovascolare; inoltre in numerosi studi trasversali la calcificazione dell'aorta addominale di grado severo è stata associata ad una maggiore prevalenza, ad un numero più elevato e ad una maggiore severità delle fratture vertebrali dopo aggiustamento per fattori confondenti, tra cui la densità minerale ossea (BMD), in entrambi i sessi. I dati relativi al collegamento tra AAC e BMD sono discordanti. L'età, il fumo, l'ipertensione, il diabete mellito, l'infiammazione sistemica sono tutti possibili fattori di rischio di AAC di grado severo e rischio di fratture. In maniera interessante, studi clinici condotti nei soggetti HIV negativi, hanno dimostrato che l'associazione tra AAC e fratture è risultata significativa dopo aggiustamento per questi fattori [96].

Ad oggi non esistono studi sull'impiego della AAC nella popolazione HIV positiva per la quale un adeguato indicatore di rischio cardiovascolare ed osseo potrebbe essere d'aiuto nell'individuare i soggetti più vulnerabili allo sviluppo di queste comorbidità, in maniera verosimilmente più precisa rispetto a quella dei classici algoritmi (Framingham, FRAX) mutuati dalla popolazione generale [55].

Sulla base di queste premesse, l'obiettivo primario del nostro studio è stato quello di valutare la presenza e la distribuzione di calcificazione aortica addominale in una coorte di pazienti con infezione da HIV e la sua correlazione con la patologia cardiovascolare e la patologia ossea, identificando i fattori clinici ed immunologici associati alla presenza di AAC.

I nostri dati hanno mostrato che la calcificazione dell'aorta addominale è più frequente nei pazienti con infezione da HIV più anziani, con un basso nadir di linfociti TCD4, con stadio più avanzato di malattia e conseguentemente più stabilmente in terapia antiretrovirale; questa popolazione più "anziana" esprimeva più frequentemente comorbidità ossea, renale e cardiovascolare come dimostrato dall'analisi univariata.

Il nostro studio conferma quindi quanto già descritto in letteratura [1,2,3] e cioè che, nonostante i successi della terapia antiretrovirale in termini di efficacia viroimmunologica e nonostante sia migliorata l'aspettativa della vita, le comorbidità ossea e cardiovascolare sono particolarmente rappresentate nella popolazione con infezione da HIV.

Per meglio poi comprendere quali fattori clinici fossero indipendentemente associati alla presenza di AAC, abbiamo condotto un'analisi multivariata che eliminasse possibili fattori confondenti: età e presenza di ispessimento dell'intima carotidea sono risultati essere fattori indipendentemente associati alla calcificazione aortica addominale.

Il nostro studio ha quindi evidenziato nella casistica esaminata un'alta prevalenza, del 17.1%, di fratture vertebrali, superiore rispetto a quella riscontrata dal nostro gruppo in un lavoro precedente [44]. Partendo da questo dato, al fine di stabilire una possibile relazione clinica fra patologia cardiovascolare e patologia ossea attraverso l'impiego dello studio della AAC, ci siamo interrogati circa i possibili fattori associati alle fratture vertebrali: in un primo modello di analisi multivariata la calcificazione aortica addominale è risultata associata a fratture vertebrali, indipendentemente da valori di densità minerale ossea, turnover osseo, vitamina D e PTH. Tali dati sono sovrapponibili a numerosi studi di letteratura sulla popolazione HIV-negativa [106, 107, 109]. Tuttavia, l'introduzione della variabile "età" nel secondo modello dell'analisi ha evidenziato una perdita di tale associazione, dimostrando, come l'età sia l'unico fattore associato a fratture vertebrali nella popolazione in esame.

Abbiamo anche analizzato quali potessero essere i fattori immunologici associati alla AAC, visto il ruolo della persistente infiammazione sistemica e dell'assetto T-linfocitario iperattivato e senescente nella patogenesi di comorbidità cardiovascolare ed ossea in soggetti HIV-positivi. Lo studio del fenotipo linfocitario CD4+ non ha mostrato differenze statisticamente significative in soggetti con e senza calcificazione aortica addominale; al contrario, l'analisi dell'immunofenotipo dei linfociti T CD8+ ha evidenziato come una maggior frequenza di cellule di memoria, ma non di linfociti attivati e apoptotici, si associ alla presenza di AAC. Tali dati, in parziale contrasto con quanto riportato in letteratura soprattutto in termini di attivazione T-linfocitaria e rischio cardiovascolare nella popolazione HIV-positiva, andranno approfonditi con studi mirati alla funzione di tali cellule e alla loro ulteriore caratterizzazione del fenotipo di memoria.

Poiché dal punto di vista eziopatogenetico si ritiene che la l'AAC rappresenti una localizzazione distrettuale del più generale processo di calcificazione vascolare definito dalla deposizione ectopica di sostanza minerale nelle pareti delle grosse arterie

e poiché l'esatto meccanismo alla base dell'associazione tra AAC e fratture non è stato ancora stato perfettamente delineato, abbiamo condotto un sottostudio volto a comprendere i possibili meccanismi attraverso cui la calcificazione aortica addominale possa rendersi responsabile di osteoporosi e fratture. Abbiamo quindi misurato i livelli di precursori osteoclastici circolanti nel sangue periferico e dimostrato che essi sono significativamente più alti in soggetti con AAC e bassa densità minerale ossea, rispetto sia a pazienti con AAC e normale densità minerale ossea sia a individui senza AAC e bassa densità minerale ossea. Tale risultato suggerisce la possibile associazione patogenetica tra AAC e riassorbimento osseo, come confermato dagli studi clinici secondo cui si ritiene che un evento unificatore di entrambi i processi possa essere indentificato in una disfunzione del sistema RANK-RANKL-OPG ed in una differente risposta allo stesso da parte del tessuto osseo e vascolare: infatti l'aumentata espressione di RANKL, in particolare, è in grado da una parte di incrementare il riassorbimento osseo e, dall'altra, di indurre la transdifferenziazione delle cellule muscolari lisce della tonaca media in cellule ossee determinando la deposizione minerale a livello vascolare [111,112].

I risultati del nostro studio hanno evidenziato l'esistenza di un'associazione tra la calcificazione aortica addominale e le comorbidità cardiovascolare (ipertensione, ispessimento mio-intimale carotideo) ed ossea (presenza di fratture) nella popolazione in studio; inoltre, nella nostra coorte di pazienti con infezione ad HIV, la calcificazione aortica addominale è risultata associata a frattura vertebrale indipendentemente dal BMD e dai markers di turnover osseo. Tale correlazione è stata ampiamente indagata sia da studi trasversali che prospettici, nei quali si evidenzia come una AAC di tipo severo si associ ad un maggior rischio di fratture vertebrali, anche dopo correzione per età, BMD ed altri fattori confondenti [106, 107, 109].

Le limitazioni del nostro studio sono tuttavia rappresentate dalla scarsa rappresentazione di popolazione femminile e dallo scarso numero di fratture di grado di severo.

Si tratta ad oggi di un dato unico presente nella popolazione con infezione da HIV, in cui osteoporosi e patologia cardiovascolare sono ad oggi molto rappresentate e causa di importanti morbidity e mortalità: per questo si può auspicare che la valutazione di AAC attraverso un esame facilmente disponibile, poco costoso e facile da eseguire, possa diventare un "marker" di utilità clinico nello screening delle comorbidità non AIDS relate

nella popolazione con infezione da HIV, al fine di meglio delineare quel “fenotipo” fragile che ormai caratterizza sempre più spesso i nostri pazienti, anche con età inferiore ai 50 anni.

**TABELLE E FIGURE**

**Tabella 1. Caratteristiche dei 280 pazienti con infezione da HIV ed in relazione all'assenza e alla presenza di AAC (AAC-: AAC-8 score=0; AAC+: AAC-8 score≥1)**

	<b>Popolazione Totale N 280</b>	<b>AAC=0 N 215 (76.8%)</b>	<b>AAC≥1 N 65 (23.2%)</b>	<b>p value</b>
<b>Età, mediana (IQR)</b>	46 (39-51)	43 (46-48)	55 (49-64)	<b>&lt;0.0001</b>
BMI, mediana (IQR)	24.1 (22.3-26.5)	24 (22.1-26.4)	24.9 (23.1-27.9)	0.06
Donne (%)	77/280 (27.5)	64/215 (29.7)	13 /65(20)	0.12
Anni di diganosi HIV, mediana (IQR)	10 (5-20)	10 (5-20)	9.5 (5-21.5)	0.80
<b>AIDS (%)</b>	54/271 (19.9)	365/208(16.8)	10/63 (30.2)	<b>0.02</b>
<b>Nadir CD4, mediana (IQR)</b>	262 (108-396)	277 (165-419)	165 (69-354)	<b>0.009</b>
<b>Pazienti in HAART (%)</b>	205/280 (73.2)	149/215 (69)	56 /65 (86)	<b>0.007</b>
Conta CD4 corrente, mediana (IQR)	476 (359-629)	475 (370-618)	490 (326-715)	0.68
CD4/CD8 ratio *, median (IQR)	0.56(0.38-0.80)	0.56 (0.37-0.82)	0.55 (0.42-0.77)	0.98
HCV-Ab (%)	26/268 (9.7)	19/ 206 (9.2)	7/62 (11.3)	0.62
Fumo (%)	148/279 (53)	107/214 (50)	41/65 (63)	0.08
<b>Ipertensione (PAS≥120 mmHG; PAD ≥90 mmHG) (%)</b>	18/280 (6.4)	9/215 (4.1)	9/65 (13.8)	<b>0.005</b>
Resistenza insulinica (Homa IR> 2.6) (%)	98/262 (37)	69/197(35)	29/65(44.6)	0.16
Diabete (HB glicata >6.5 o glicemia ≥ 126 mg/dl) (%)	31/277 (11.2)	20/213(9)	11/64(17)	0.08
<b>cIMT aumentata (&gt;1mm, &lt;1.5mm) o placca carotidea (&gt;1.5 mm) (%)</b>	142/280 (50.7)	91/215 (42.3)	51/65 (78.4)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>GFR&lt; 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (%)</b>	9/280 (3.2)	4 /215 (1.8)	5/65 (7.6)	<b>0.02</b>
<b>BMD ridotto (T-score o Z-score&lt;-1) (%)</b>	163/280 (58.2)	115/215 (60.2)	48/65(75)	<b>0.003</b>
<b>SDI&gt;=1</b>	47/274 (17.1)	30/210 (14.3)	17/64 (26.5)	<b>0.02</b>

**Legenda-** IQR: range interquartile; AAC: abdominal aortic calcification, calcificazione aortica addominale; BMI: body mass index, indice di massa corporea; AIDS: sindrome dell'immunodeficienza acquisita; HAART: High active antiretroviral therapy, terapia antiretrovirale altamente attiva; HCV-Ab: anticorpi anti-virus dell'epatite C; PAS: pressione arteriosa sistolica; PAD: pressione arteriosa diastolica; HOMA-IR: homeostatic model assessment of insulin resistance; DM: diabete mellito; cITM: carotid intima media thickness, spessore medio-intimale della carotide interna; GFR: volume del filtrato glomerulare; BMD: bone mineral density ,densità minerale ossea; SDI: spine deformity index, indice di deformità vertebrale.

**Tabella 2. Variabili associate con AAC  $\geq 1$ : analisi univariata (u) e multivariata (m)**

	<b>OR (IC95%)</b>	<b>p-value (u)</b>	<b>AOR (IC95%)</b>	<b>p-value(m)</b>
<b>Età (ogni 10 anni in più)</b>	3.81 (2.64-5.51)	<b>&lt;.001</b>	2.78 (1.78-4.34)	<b>&lt;.0001</b>
<b>BMI (ogni unità in più)</b>	1.07 (1.00-1.14)	<b>.02</b>	1.04 (0.96-1.12)	.31
<b>Nadir CD4+ (ogni 50 cell in più)</b>	0.89 (0.82-0.97)	<b>.01</b>	1.00 (0.88-1.14)	.94
<b>AIDS diagnosi</b>	2.13 (1.11-4.08)	<b>.02</b>	1.46 (0.54-3.93)	.44
<b>HAART (vs naive)</b>	2.75 (1.28-5.90)	<b>.009</b>	1.03 (0.31-3.36)	.96
<b>Iperensione (PAS <math>\geq 120</math> mmHg, PAD <math>\geq 90</math> mmHg)</b>	3.67 (1.39-9.07)	<b>.008</b>	2.4 (0.72-8.29)	0.15
<b>cIMT aumentata (&gt;1mm, &lt;1.5mm) o placca carotidea (&gt;1.5 mm)</b>	4.96 (2.59-9.50)	<b>&lt;.001</b>	2.8 (1.22-6.41)	<b>0.01</b>
<b>GFR &lt; 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup></b>	4.39 (1.14-16.8)	<b>0.03</b>	0.88 (0.15-4.88)	0.88
<b>BMD ridotto (T-score o Z-score &lt; -1)</b>	2.45 (1.32-4.54)	<b>0.04</b>	2.36 (0.99-5.35)	0.05
<b>SDI <math>\geq 1</math></b>	2.17 (1.10-4.16)	<b>.02</b>	1.21 (0.46-3.15)	0.69

**Legenda** - AAC: abdominal aortic calcification, calcificazione aortica addominale; OR: odds ratio; AOR: *adjusted odds ratio*; IC: *intervallo di confidenza* BMI: body mass index, indice di massa corporea; HAART: High active antiretroviral therapy, terapia antiretrovirale altamente attiva; PAS: pressione arteriosa sistolica; PAD: pressione arteriosa diastolica; cITM: carotid intima media thickness, spessore medio-intimale della carotide interna; GFR: volume del filtrato glomerulare; BMD: bone mineral density ridotto: T-score o Z-score < -1; SDI: spine deformity index; indice di deformità vertebrale AAC-: AAC-8 score=0; AAC+: AAC-8 score  $\geq 1$ .

**Tabella 3. Fattori associati a frattura vertebrale subclinica silente (SDI $\geq$ 1)**

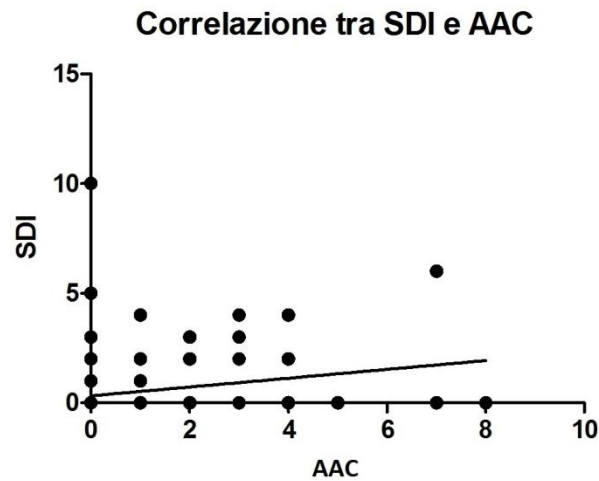
	Modello 1		Modello 2	
	AOR per SDI $\geq$ 1 (IC95%)	p-value	AOR per SDI $\geq$ 1 (IC95%)	p-value
Età	/	/	1.03 (0.99-1.08)	0.06
Sesso femminile	0.65 (0.26-1.64)	0.36	0.70 (0.27-1.76)	0.45
AAC+	2.74 (1.25-6)	<b>0.01</b>	1.82 (0.74-4.43)	0.18
BMD ridotto (T-score o Z-score<-1)	0.69 (0.32-1.48)	0.34	0.63 (0.29-1.36)	0.24
Turnover osseo aumentato	2.11 (0.93-4.91)	0.07	2.34 (1-5.47)	<b>0.04</b>
Carenza di vitamina D (<30ng/ml)	1.75 (0.54-5.62)	0.34	1.83 (0.56-5.92)	0.31
PTH aumentato (65> pg/ml)	0.70 (0.30 -1.61)	0.40	0.60 (0.25 -1.42)	0.25

**Legenda** - OR: odds ratio; AOR: *adjusted odds ratio*; IC: *intervallo di confidenza*; AAC: abdominal aortic calcification, calcificazione aortica addominale; BMD: bone mineral density, densità minerale ossea; PTH: paratormone; AAC+: AAC-8 score $\geq$ 1

L'analisi di regressione logistica multivariata utilizzata ha incluso l'esistenza di associazione tra FV, definite come SDI $\geq$ 1, ed una serie di condizioni quali: sesso femminile, AAC, BMD ridotto, incremento dei markers di turnover osseo, carenza di vitamina D ed aumentati livelli di PTH circolanti (modello 1); nel secondo modello è stata inserita anche l'età (modello 2).

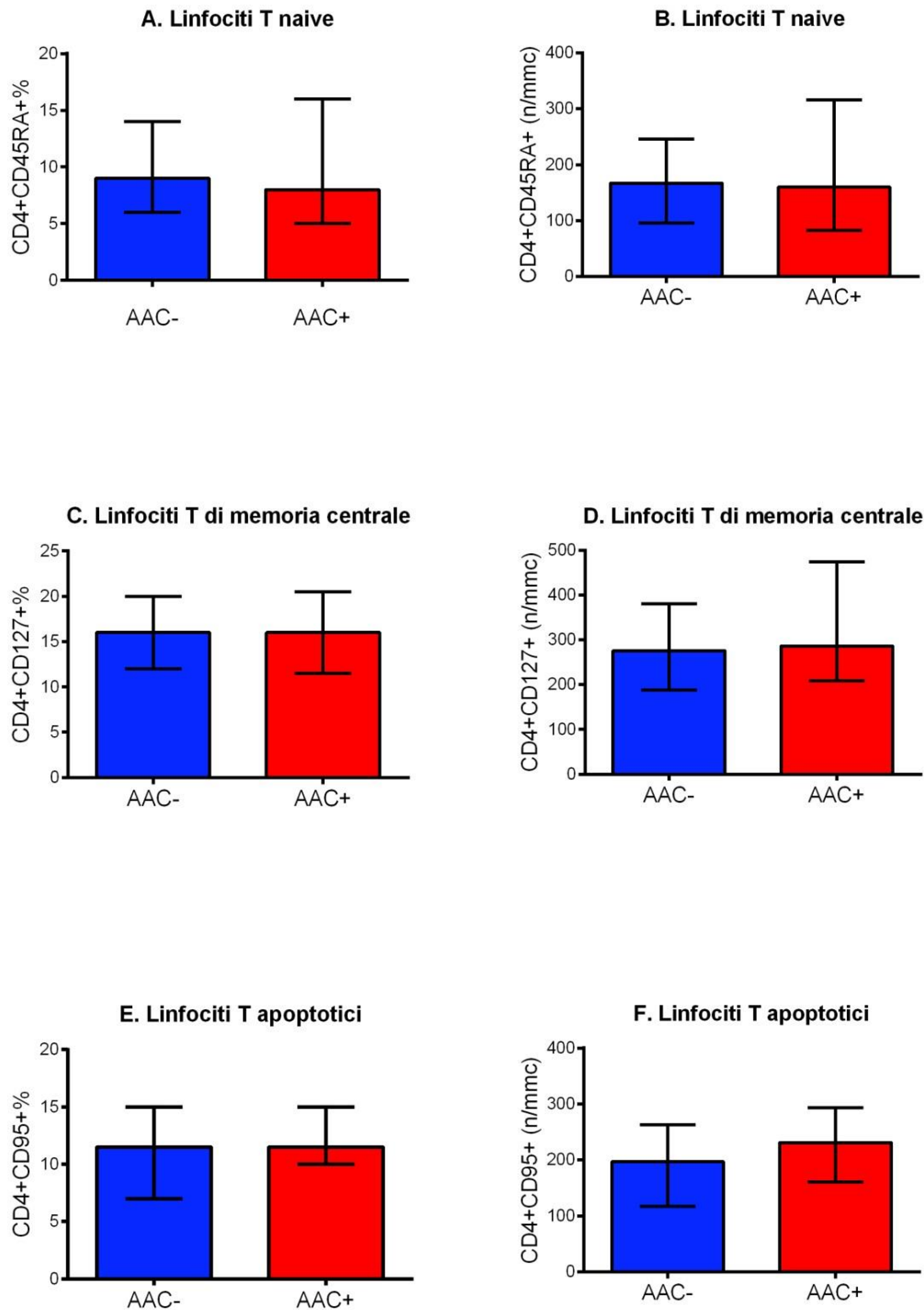


**Figura 1: Associazione tra AAC e FV secondo la correlazione di Spearman (rho=0.16;p =0.02)**



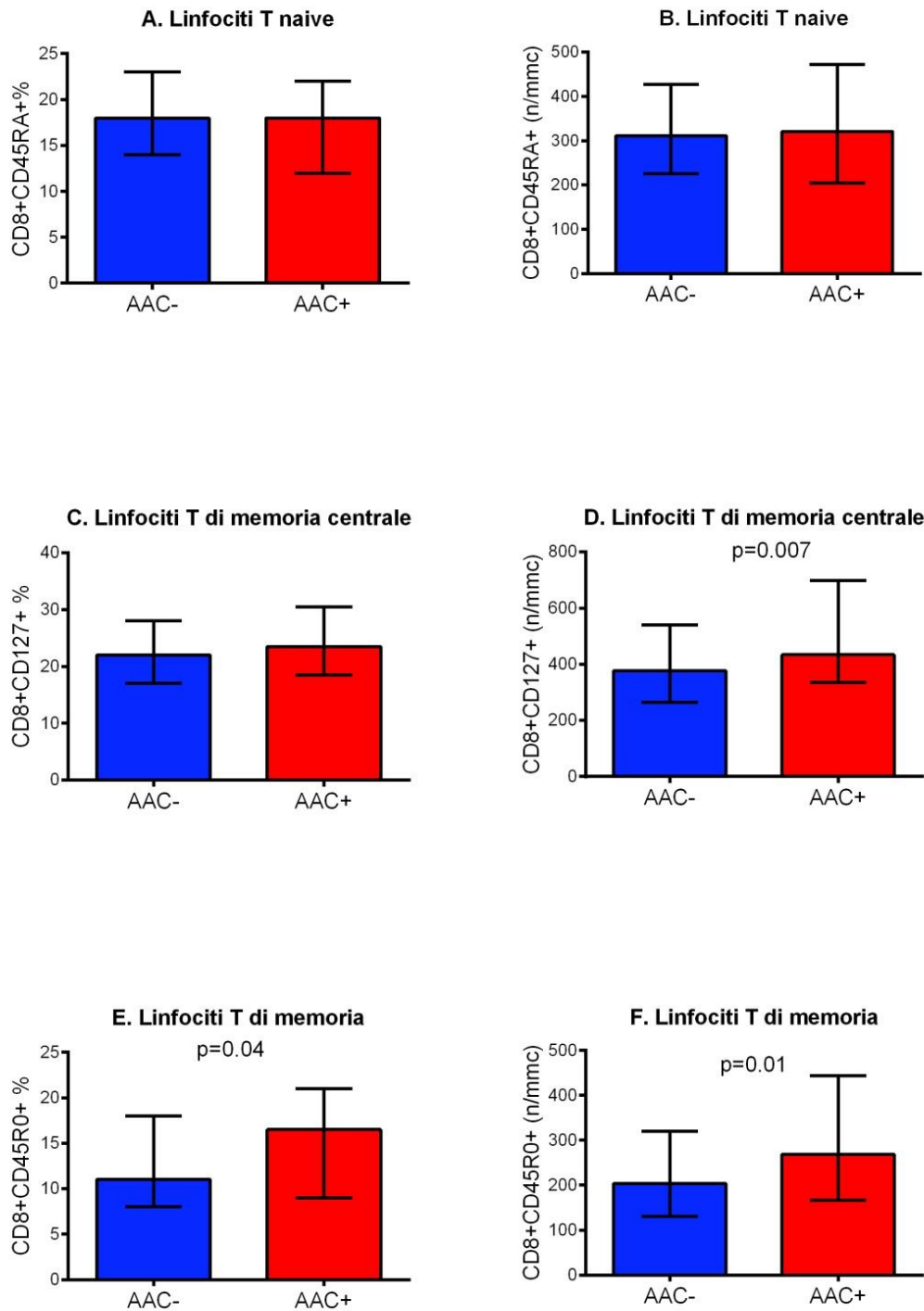
**Legenda** - La correlazione di Spearman evidenzia come la severità della AAC sia direttamente correlata alla presenza di FV ( $SDI \geq 1$ ) ed al loro grado. AAC: abdominal aortic calcification, calcificazione aortica addominale; FV: fratture vertebrali; SDI: spine deformity index

**Figura 2: Linfociti T CD4+ naive, di memoria ed apoptotici nei pazienti in studio**



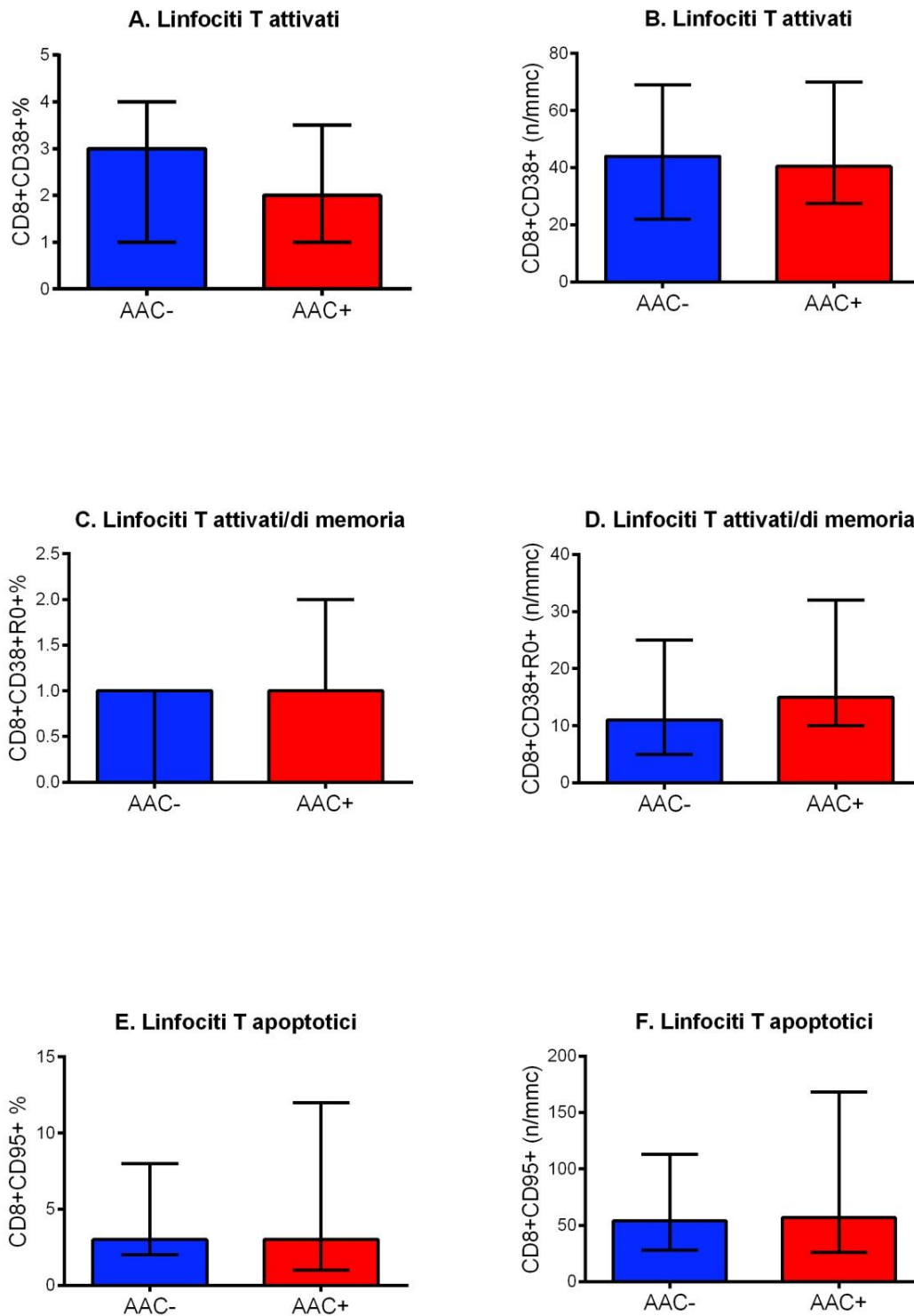
**Legenda** - Lo studio dell'assetto immunofenotipico dei linfociti T CD4+ non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra pazienti con e senza calcificazione aortica addominale (abdominal aortic calcification; rispettivamente AAC+ e AAC-), in termini di cellule naive (A, B), di memoria centrale (C, D) e apoptotiche (E, F). AAC-: AAC-8 score=0; AAC+: AAC-8 score $\geq$ 1.

**Figura 3: Linfociti T CD8+ naive, di memoria centrale e di memoria nei pazienti in studio**



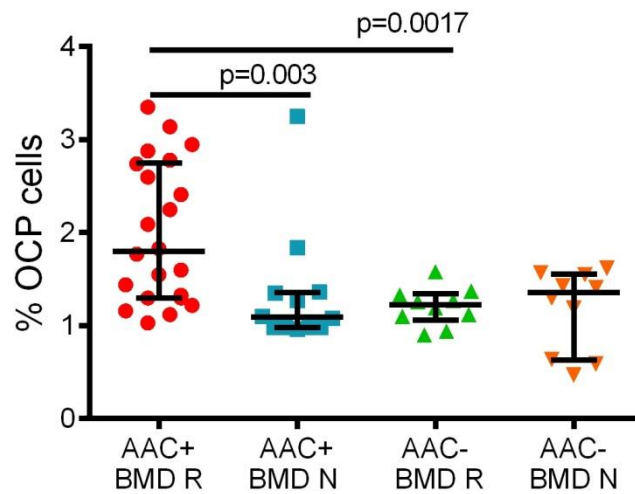
**Legenda** - Lo studio dell'assetto immunofenotipico dei linfociti T CD8+ in pazienti con e senza calcificazione aortica addominale (abdominal aortic calcification; rispettivamente AAC+ e AAC-) non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i due gruppi in termini di linfociti naive (A, B) e di valore percentuale di cellule di memoria centrale (C). Al contrario, i soggetti AAC+ hanno mostrato livelli significativamente superiori del numero assoluto di T CD8+ di memoria centrale (D), e di memoria (E, F). AAC-: AAC-8 score=0; AAC+: AAC-8 score $\geq$ 1.

**Figura 4. Linfociti T CD8+ attivati, attivati/di memoria ed apoptotici nei pazienti in studio**



**Legenda** - Lo studio dell'assetto immunofenotipico dei linfociti T CD8+ non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra pazienti con e senza calcificazione aortica addominale (abdominal aortic calcification; rispettivamente AAC+ e AAC-) in termini di cellule attivate (A, B), di memoria attivate (C, D) e apoptotiche (E, F). AAC-: AAC-8 score=0; AAC+: AAC-8 score $\geq$ 1.

**Figura 5. Livelli di precursori osteoclastici circolanti in pazienti con pazienti AAC- e AAC+ e con BMD R (ridotto) e con BMD N (normale)**



**Legenda** - Sono state riscontrate differenze statisticamente significative (Kruskal-Wallis test,  $p=0.025$ ) in termini di frequenze dei precursori osteoclastici (OCP) fra i gruppi di soggetti in studio. In particolare, i pazienti AAC+ e con BMD R hanno mostrato livelli di OCP significativamente superiori rispetto ai pazienti AAC+ con BMD N e a individui AAC- con BMD R. AAC: abdominal aortic calcification, calcificazione aortica addominale; AAC-: AAC-8 score=0; AAC+: AAC-8 score $\geq$ 1; BMD: bone mineral density, densità minerale ossea; R:ridotta (T-score <-1); N:normale (T-score $\geq$ -1).

## NOTE BIBLIOGRAFICHE

1. Guaraldi G. et al. Premature age-related comorbidities among HIV- infected persons compared with the general population *CID* 2011; 53 (11): 1120-1126
2. Capeau J. Premature aging and premature age- related comorbidities in HIV- infected patients: Facts and Hypotheses *CID* 2011; 53 (11):1127-1129
3. Vance DE et al. Predictions of geriatric HIV in 2030. *Lancet Infect Dis.* 2015 Jul;15(7):753-4
4. Effros R.B. et al. Workshop on HIV infection and Aging: what is known and future research directions *CID* 2008. 47 (15 August) : 542-553.
5. Deeks S.G; Phillips A. N HIV infection, antiretroviral treatment, aging and non AIDS relate morbidity *BMJ* 2009.338:288-338.
6. Hunt P. W HIV and Inflammation: Mechanisms and Consequences *Curr HIV/AIDS Rep* (2012) 9:139–147
7. Deeks S.G. HIV infection, Inflammation, Immunosenescence and Aging *Ann. Rev. Med.* 2011.62:141-155.
8. Dubè M.P. Inflammation and Complications of HIV disease *JID* 2010:201 (15 June) 1783-1785
9. Gottlieb MS. et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med.* 1981;305(24):1425–31
10. Fahey JL. et al. Prognostic significance of plasma markers of immune activation, HIV viral load and CD4 T-cell measurements. *AIDS.* 1998;12(13):1581–90
11. Liu Z. et al. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1997;16 (2):83–92
12. Burdo TH. et al. Soluble CD163 made by monocyte/macrophages is a novel marker of HIV activity in early and chronic infection prior to and after anti-retroviral therapy. *J Infect Dis* 2011, 204(1): p. 154–63
13. Tincati C. et al. Impaired gut junctional complexes feature late-treated individuals with suboptimal CD4+ T-cell recovery upon virologically-suppressive cART. *AIDS*, 2016
14. Rajasuriar R. et al. Biological determinants of immune reconstitution in HIV- infected patients receiving antiretroviral therapy: the role of interleukin 7 and interleukin 7 receptor  $\alpha$  and microbial translocation. *J Infect Dis*, 2010. 202(8): p. 1254-64

15. O'Halloran J.A. et al. The effect of initiation of antiretroviral therapy on monocyte, endothelial and platelet function in HIV-1 infection. *HIV Med*, 2015. 16(10): p. 608-19
16. Hearps A.C. et al. HIV infection induces age-related changes to monocytes and innate immune activation in young men that persist despite combination antiretroviral therapy. *AIDS*, 2012. 26(7): p. 843-53
17. Rönsholt F.F. et al. Persistent inflammation and endothelial activation in HIV-1 infected patients after 12 years of antiretroviral therapy. *PLoS One*, 2013. 8(6): p. e65182
18. Douek D.C. et al. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol*, 2003. 21: p. 265-304
19. Valdez H. et al., Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. *AIDS*, 2002. 16(14): p. 1859-66
20. Hunt P.W. et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, 2003. 187(10): p. 1534-43
21. Brenchley J.M. et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*, 2003. 101(7): p. 2711-20
22. Bonora S. et al. Ultrasensitive assessment of residual HIV viremia in HAART-treated patients with persistently undetectable plasma HIV-RNA: a cross-sectional study. *J. Med. Virol.* 2009; 81: 400-405
23. Maggiolo F. et al. Ultrasensitive assessment of residual low-level HIV viremia in HAART-treated patients and risk of virological failure *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012 Aug 15;60(5):473-82
24. Appay V. et al. Old age and anti-cytomegalovirus immunity are associated with altered T-cell reconstitution in HIV-1-infected patients. *AIDS* 2011; 25:1813–22.
25. Rugarli C. *Medicina Interna Sistematica Quarta edizione Parte Quinta Capitolo 35 “ Malattia delle ossa”*
26. Borderi M. et al. Metabolic bone disease in HIV infection *AIDS* 2009, 23:1297–1310
27. De Crignis E. et al Bone alterations during HIV infection *NEW MICROBIOLOGICA*, 31, 155-164, 2008
28. Hileman C.O. et al. Bone loss in HIV: a contemporary review *Curr Opin Endocrinol Obes* 2015, 22:446-451
29. Brown TT. Challenges in the management of osteoporosis and vitamin D deficiency in HIV infection *Top Antivir Med.* 2013 Jul-Aug;21(3):115-8
30. M. B. Multifattorialità del danno osseo da HIV/HAART. *Le Infezioni in Medicina.*, 2006

31. Persy, V. and P. D'Haese, Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox. *Trends Mol Med*, 2009. 15(9): p. 405-16
32. Güerri-Fernández, R., et al., HIV infection, bone metabolism, and fractures. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2014. 58(5): p. 478-83
33. Brown, T.T. et al. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *AIDS*, 2006. 20(17): p. 2165-74
34. Escota G.V. et al. High Prevalence of Low Bone Mineral Density and Substantial Bone Loss over 4 Years Among HIV-Infected Persons in the Era of Modern Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2016. 32(1): p. 59-67
35. Grund B. et al. Continuous antiretroviral therapy decreases bone mineral density. *AIDS*, 2009. 23(12): p. 1519-29
36. PARSONAGEM.J. et al (2005). The development of hypophosphataemic osteomalacia with myopathy in two patients with HIV infection receiving tenofovir therapy. *HIV Medicine*. 6, 341-346
37. Gallant J.E. et al. Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naive patients: a 3-year randomized trial. *JAMA*, 2004. 292(2): p. 191-201
38. 73. McComsey G.A. et al. Bone mineral density and fractures in antiretroviral-naive persons randomized to receive abacavir-lamivudine or tenofovir disoproxil fumarate-emtricitabine along with efavirenz or atazanavir-ritonavir: Aids Clinical Trials Group A5224s, a substudy of ACTG A5202. *J Infect Dis*, 2011. 203(12): p. 1791-801
39. Bedimo R. et al. Osteoporotic fracture risk associated with cumulative exposure to tenofovir and other antiretroviral agents. *AIDS*, 2012. 26(7): p. 825-31
40. Vescini F et al. Icona Foundation Study Group Prevalence of hypovitaminosis D and factors associated with vitamin D deficiency and morbidity among HIV-infected patients enrolled in a large Italian cohort *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011 Oct 1;58(2):163-72
41. Fink HA et al. What proportion of incident radiographic vertebral deformities is clinically diagnosed and vice versa? *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1216–1222
42. Crans GG. Et al. Prognostic utility of a semiquantitative spinal deformity index. *Bone* 2005; 37: 175–179
43. Lenchik L et al Diagnosis of osteoporotic vertebral fractures: importance of recognition and description by radiologists. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 183: 949–958
44. Gazzola L. et al Assessment of radiological vertebral fractures in HIV-infected patients: clinical implication and predictive factors *Hiv Medicine* 2015 Oct;16(9):563-71



45. Torti C. et al. High prevalence of radiological vertebral fractures in HIV-infected males. *Endocrine* 2012; 41: 512–517. 16
46. Borderi M. et al. Prevalence of sub-clinical vertebral fractures in HIV-infected patients. *New Microbiol* 2014; 37: 25–32
47. Castronuovo D. et al. Bone disease in the setting of HIV infection: update and review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013. 17(18): p. 2413-9
48. Gibellini, D. et al., HIV-1 triggers apoptosis in primary osteoblasts and HOBIT cells through TNFalpha activation. *J Med Virol*, 2008. 80(9): p. 1507-14
49. Cotter E.J. et al., HIV proteins regulate bone marker secretion and transcription factor activity in cultured human osteoblasts with consequent potential implications for osteoblast function and development. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2007. 23(12): p. 1521-30
50. Cotter E.J. et al. Is PPAR $\gamma$  a prospective player in HIV-1-associated bone disease? *PPAR Res*, 2009. 2009: p. 421376
51. Gazzola, L. et al. Association between peripheral T-Lymphocyte activation and impaired bone mineral density in HIV-infected patients. *J Transl Med*, 2013. 11: p. 51
52. Erlandson, K.M. et al. Relationships between inflammation, immune activation, and bone health among HIV-infected adults on stable antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2014. 65(3): p. 290-8
53. Lewis W. et al. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nat Med*, 1995. 1(5): p. 417-22
54. Carr, A. et al. Osteopenia in HIV-infected men: association with asymptomatic lactic acidemia and lower weight pre-antiretroviral therapy. *AIDS*, 2001. 15(6): p. 703-9
55. Linee guida Italiane sull'utilizzo dei farmaci antiretrovirali e sulla gestione diagnostico clinica delle persone con infezione da HIV-1, edizione 17 dicembre 2015
56. Brown T.T. et al. Recommendations for evaluation and management of bone disease in HIV. *Clin Infect Dis*, 2015. 60(8): p. 1242-51
57. Clò A. et al. Calcaneal quantitative ultrasound (QUS) and dual -ray absorptiometry (DXA) bone analysis in adult HIV-positive patients. *New Microbiol* 2015,38 (3) p.345.56
58. Cardiovascular Diseases - Fact sheet N°317. 2015; Available from: [www.who.int](http://www.who.int).
59. Golia E. et al. Inflammation and cardiovascular disease: from pathogenesis to therapeutic target. *Curr Atheroscler Rep*, 2014. 16(9): p. 435
60. Rugarli C. *Medicina interna sistematica. - Capitolo 4: Aterosclerosi*. Sesta ed. 2010: Elsevier-Masson
61. D'Etorre G. et al. What happens to cardiovascular system behind the undetectable level of HIV viremia? *Aids Res Ther* (2016) 13:21

62. Freiberg MS. et al. HIV infection and the risk of acute myocardial infarction. *JAMA Intern Med.* 2013;173:614–22
63. Silverberg MJ et al. Immunodeficiency and risk of myocardial infarction among HIV-positive individuals with access to care. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2014;65:160–6.
64. Klein DB et al. Declining relative risk for myocardial infarction among HIV-positive compared with HIV-negative individuals with access to care. *Clin Infect Dis.* 2015;60:1278–80
65. So-Armah K. et al. Cardiovascular disease risk in an aging HIV population: not just a question of biology. *Curr Opin HIV AIDS,* 2014. 9(4): p. 346-54
66. Friis-Møller N. et al., Cardiovascular disease risk factors in HIV patients--association with antiretroviral therapy. Results from the DAD study. *AIDS,* 2003. 17(8): p. 1179-93
67. Triant, V.A., et al., Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J Clin Endocrinol Metab,* 2007. 92(7): p. 2506-12
68. Bedimo R. et al. Hepatitis C virus coinfection and the risk of cardiovascular disease among HIV-infected patients. *HIV Med,* 2010. 11(7): p. 462-8
69. Freiberg M.S et al. The risk of incident coronary heart disease among veterans with and without HIV and hepatitis C. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes,* 2011. 4(4): p. 425-32
70. Hechter R.C. et al. Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) as a coronary atherosclerosis risk factor in HIV-infected men: multicenter AIDS cohort study. *Atherosclerosis,* 2012. 223(2): p. 433-6
71. Parrinello C.M. et al. Cytomegalovirus immunoglobulin G antibody is associated with subclinical carotid artery disease among HIV-infected women. *J Infect Dis,* 2012. 205(12): p. 1788-96
72. Lifson AR, et al. Smoking-related health risks among persons with HIV in strategies for management of antiretroviral therapy clinical trial. *Am J Public Health.* 2010;100:1896–903
73. Brown TT. et al. Antiretroviral therapy and the prevalence and incidence of diabetes mellitus in the multicenter AIDS cohort study. *Arch Intern Med.* 2005;165:1179–84
74. D’Ettorre G. et al. Impact of switching from lopinavir/ritonavir to boosted and un-boosted atazanavir on glucose metabolism: ATAZANAVIR & GLUCOSE METABOLISM (ATAGLU) study. *Int J STD AIDS.* 2015
75. El-Sadr WM. et al. For Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *Engl J Med.* 2006 Nov 30;355(22):2283-96
76. Kuller L.H. et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection *Plos Med,* 2008.5(10) p.e 203

77. Duprez. D.A. et al. Inflammation, coagulation and cardiovascular disease in HIV-infected individuals. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. e44454
78. Troseid M. et al Microbial translocation and acrdiometabolic risk factors in HIV infection *AIDS Res Hum Retroviruses* 2014. 30 (6):514-22
79. French M.A. et al. Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4+ T cells. *J Infect Dis*, 2009. 200(8): p. 1212-5
80. Merlini E. et al. T-cell phenotypes, apoptosis and inflammation in HIV+ patients on virologically effective cART with early atherosclerosis. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. e46073
81. Martin GE. et al. Age-associated changes in monocyte and innate immune activation markers occur more rapidly in HIV infected women. *PLoS ONE*. 2013;8:e55279
82. Longenecker C.T. et al. Soluble CD14 is independently associated with coronary calcification and extent of subclinical vascular disease in treated HIV infection. *AIDS*, 2014. 28(7): p. 969-77
83. Zanni M.V. et al. Increased coronary atherosclerotic plaque vulnerability by coronary computed tomography angiography in HIV-infected men. *AIDS*, 2013. 27(8): p. 1263-72
84. Lichtner M et al ICONA Foundation Study. Cytomegalovirus coinfection is associated with an increased risk of severe non-AIDS-defining events in a large cohort of HIV-infected patients. *J Infect Dis*. 2015;211:178–86
85. Bavinger C. et al. Risk of cardiovascular disease from antiretroviral therapy for HIV: a systematic review. *PLoS One*, 2013. 8(3): p. e59551
86. Cruciani M. et al. Abacavir use and cardiovascular disease events: a meta-analysis of published and unpublished data. *AIDS*, 2011. 25(16): p. 1993-2004
87. EACS guidelines. Versione 8. October 2015
88. Friis-Møller N. et al. Predicting the risk of cardiovascular disease in HIV-infected patients: the data collection on adverse effects of anti-HIV drugs study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2010. 17(5): p. 491-501
89. Lifson A.R. et al. Smoking-related health risks among persons with HIV in the Strategies for Management of Antiretroviral Therapy clinical trial. *Am J Public Health*, 2010. 100(10): p. 1896-903
90. Helleberg M. et al. Mortality attributable to smoking among HIV-1-infected individuals: a nationwide, population-based cohort study. *Clin Infect Dis*, 2013. 56(5): p. 727-34
91. Ganesan A. et al. High dose atorvastatin decreases cellular markers of immune activation without affecting HIV-1 RNA levels: results of a double-blind randomized placebo controlled clinical trial. *J Infect Dis*, 2011. 203(6): p. 756-64

92. Calza L. et al. Statin therapy decreases serum levels of high-sensitivity C-reactive protein and tumor necrosis factor- $\alpha$  in HIV-infected patients treated with ritonavir-boosted protease inhibitors. *HIV Clin Trials*, 2012. 13(3): p. 153-61
93. Hemkens L.G. et al. HIV infection and cardiovascular disease. *Eur Heart J*, 2014. 35(21): p. 1373-81
94. Ridke, P.M et al, Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*, 2008. 359(21): p. 2195-207
95. O'Brien M. et al. Aspirin attenuates platelet activation and immune activation in HIV-1-infected subjects on antiretroviral therapy: a pilot study. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2013. 63(3): p. 280-8
96. Szulc P. Vascular calcification and fracture risk Mini review clinical cases in *Mineral and Bone Metabolism* 2015; 12 (2) 139-141
97. Tankó L.B. et al. Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*, 2005. 20(11): p. 1912-20
98. Genant H.K. et al. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res*, 1993. 8(9): p. 1137-48
99. Chiang C.H. et al. Hip fracture and risk of acute myocardial infarction: a nationwide study. *J Bone Miner Res*, 2013. 28(2): p. 404-11
100. Chen Y.C. et al. Hospitalized osteoporotic vertebral fracture increases the risk of stroke: a population-based cohort study. *J Bone Miner Res*, 2013. 28(3): p. 516-23
101. Sennerby U. et al. Cardiovascular diseases and risk of hip fracture. *JAMA*, 2009. 302(15): p. 1666-73
102. Van Diepen S. et al. Heart failure is a risk factor for orthopedic fracture: a population-based analysis of 16,294 patients. *Circulation*. 2008;118:1946-1952.7
103. Carbone L. et al. Hip fracture and heart failure: findings from the Cardiovascular Health Study. *Eur Heart J*. 2010;31:77-84
104. Wilson P.W. et al. Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation*, 2001. 103(11): p. 1529-34
105. Bastos Gonçalves F. et al. Calcification of the abdominal aorta as an independent predictor of cardiovascular events: a meta-analysis. *Heart*, 2012. 98(13): p. 988-9
106. El Maghraoui A. et al. Relationship between vertebral fracture prevalence and abdominal aortic calcification in men. *Rheumatology (Oxford)*, 2012. 51(9): p. 1714-20
107. El Maghraoui A. et al. Vertebral fractures and abdominal aortic calcification in postmenopausal women. A cohort study. *Bone*, 2013. 56(1): p. 213-9

108. Szulc P. et al. Calcifications in the abdominal aorta predict fractures in men: MINOS study. *J Bone Miner Res*, 2008. 23(1): p. 95-102
109. Szulc P. et al. Severity of aortic calcification is positively associated with vertebral fracture in older men--a densitometry study in the STRAMBO cohort. *Osteoporos Int*, 2013. 24(4): p. 1177-84
110. Szulc P. Abdominal aortic calcification: A reappraisal of epidemiological and pathophysiological data. *Bone*, 2016. 84: p. 25-37
111. Kurabayash, M. [Bone metabolism and cardiovascular function Update. Vascular calcification as a manifestation of bone-vascular axis]. *Clin Calcium*, 2014. 24(7): p. 11-9
112. Panizo S. et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res*, 2009. 104(9): p. 1041-8
113. Bucay N. et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 1998. 12(9): p. 1260-8
114. Kauppila L.I. et al. New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: a 25-year follow-up study. *Atherosclerosis*, 1997. 132(2): p. 245-50.
115. Schousboe J.T. et al. Detection of aortic calcification during vertebral fracture assessment (VFA) compared to digital radiography. *PLoS One*, 2007. 2(8): p. e715
116. Schousboe J.T. et al Detection of abdominal aortic calcification with lateral spine imaging using DXA. *J Clin Densitom*, 2006. 9(3): p. 302-8
117. Agatston A.S. et al. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol*, 1990. 15(4): p. 827-32
118. Szulc P. et al Abdominal aortic calcification and risk of fracture among older women – the SOF study *Bone* 81 (2015) 16-23
119. Wang T.K. et al. Relationships between vascular calcification, calcium metabolism, bone density, and fractures. *J Bone Miner Res*, 2010. 25(12): p. 2777-85
120. Aoyagi K. et al. Low bone density is not associated with aortic calcification. *Calcif Tissue Int*, 2001. 69(1): p. 20-4
121. Iannotti N. et al. Association between abdominal aortic calcifications, bone mineral density and vertebral fractures in a cohort of HIV-positive patients. *J Int AIDS Soc*, 2014. 17(4 Suppl 3): p.19715