



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dottorato XXV CICLO

Scienze Infettivologiche e Terapie Immunologiche

Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive

Anno Accademico 2011-2012

**Infezione da HIV come malattia infiammatoria:
patogenesi del danno cardiovascolare.**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Vincenzo Vullo

Dottoranda:

Alessandra D'Abramo

La vita è un'opportunità, coglila
La vita è bellezza, ammirala
La vita è beatitudine, assaporala
La vita è un sogno, fanne una realtà
La vita è una sfida, affrontala
La vita è un dovere, compilo
La vita è un gioco, giocalo
La vita è preziosa, abbine cura
La vita è una ricchezza, conservala
La vita è amore, godine
La vita è un mistero, scopriilo
La vita è una promessa, adempila
La vita è tristezza, superala
La vita è un inno, cantalo
La vita è una lotta, vivila
La vita è una gioia, gustala
La vita è una croce, abbracciala
La vita è un'avventura, rischiala
La vita è pace, costruiscila
La vita è felicità, meritata
La vita è vita, difendila

Madre Teresa di Calcutta

INDICE

INTRODUZIONE.....	5
INFEZIONE DA HIV.....	5
IMMUNOPATOGENESI.....	5
IMMUNOATTIVAZIONE.....	7
IMMUNOSENESCENZA.....	11
TERAPIA ANTIRETROVIRALE.....	15
ATEROSCLEROSI.....	18
EZIOPATOGENESI.....	21
ATEROSCLEROSI ED HIV.....	26
SISTEMA RANK/RANKL/OPG.....	31
RANKL.....	31
RANK.....	32
OPG.....	33
RANKL/RANK/OPG: SISTEMA IMMUNE E VASCOLARE.....	36
PARTE SPERIMENTALE:	
OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	40
MATERIALI E METODI.....	42
POPOLAZIONE IN STUDIO.....	42
STUDIO I.....	42
STUDIO II.....	42
ESAMI STRUMENTALI.....	43
TAC CUORE E CORONAROGRAFIA.....	43
ECOCOLORDOPPLER.....	44
DETERMINAZIONE IL-6 ED OPG.....	44

IMMUNOATTIVAZIONE ED IMMUNOSENESCENZA.....	44
HIV-RNA E CONTA DEI LINFOCITI T CD4+ E CD8+.....	47
ALTRI ESAMI EMATOCHIMICI.....	47
ALTRI PARAMETRI.....	47
ANALISI STATISTICA.....	48
RISULTATI.....	49
STUDIO I.....	49
STUDIO II.....	55
CONCLUSIONI.....	72
BIBLIOGRAFIA.....	82

INTRODUZIONE

INFEZIONE DA HIV

Immunopatogenesi

Il primo evento caratterizzante l'infezione da HIV dopo il contatto con il virus, è il legame della proteina virale gp120 dell'envelope con il recettore di superficie CD4 ed altri co-recettori per le chemochine CXCR4 e CCR5, proteine membri della superfamiglia dei recettori accoppiati alle proteine G, necessari per l'infezione dei linfociti T (Veazey RS et al; 2003). In virtù dell'espressione del CD4 possono essere infettate altre cellule quali monociti, cellule di Langherans, cellule dendritiche, cellule gliali e le cellule retiniche.

Un ruolo fondamentale nella prima fase dell'infezione e nella fase di latenza del virus nei reservoirs lo svolgono le cellule presentanti l'antigene (APC) rappresentate dalle cellule dendritiche e dai macrofagi che esprimono recettori appartenenti ai PRRs (pattern recognition receptors) di cui fanno parte i mannose binding receptors ed i Toll like receptors. Quest'ultimi, in particolar modo, dopo l'interazione con il ligando inducono l'NF- κ B con conseguente espressione di citochine pro infiammatorie (Brenchley JM et al 2004). Nel corso dell'infezione si vengono a determinare due distinti compartimenti virologici in continua comunicazione tra di loro: un compartimento attivo, in cui il virus si moltiplica arrecando danni al sistema immunitario dell'organismo ospite ed un compartimento di latenza, costituito dal virus in fase di quiescenza. Questi compartimenti di latenza

sono rappresentati da organi come il cervello e le gonadi e da cellule come ad esempio le cellule follicolari dendritiche linfonodali, i macrofagi ed i linfociti T CD4+ memory. Questi compartimenti costituiscono dei reservoirs naturali di HIV responsabili della persistenza dell'infezione anche in corso di terapia antiretrovirale. In corso di infezione da HIV si sviluppa una risposta immunitaria specifica mediata da due diversi tipi di linfociti: i linfociti B, responsabili dell'immunità umorale mediante la produzione di anticorpi ed i linfociti T, responsabili dell'immunità cellulo-mediata. I linfociti T si dividono in T-helper CD4+ e T-citotossici CD8+. Nell'ambito dei linfociti T CD4+ si riconoscono due sottopopolazioni: Th1 e Th2 che producono due diversi spettri di citochine. I Th1 sono deputati alla produzione delle citochine IL-2 ed INF- γ la cui principale funzione effettrice si realizza nella difesa contro le infezioni mediate dai fagociti e quindi contro i microrganismi intracellulari mentre i Th2 producono IL4 ed IL5, mediatori delle reazioni allergiche ma soprattutto implicati nella difesa contro i microrganismi extracellulari. L'attivazione Th1 e Th2 è reciprocamente esclusiva quindi la risposta immunitaria verso un antigene può essere solo di tipo 1 o 2. Tutto questo ha fatto sì che le citochine venissero classificate in due gruppi: Type 1 (IL-2, IL-12, IL-15 ed INF- γ), citochine pro-infiammatorie che hanno un'azione stimolatoria sulla risposta immunitaria cellulo-mediata e citochine Type-2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ed IL-13) anti-infiammatorie che hanno un'azione sulla risposta umorale. L'attivazione dell'immunità cellulo-mediata tende a provocare una regolazione negativa della risposta umorale e viceversa. Si è dimostrato che l'infezione da HIV è un esempio di alterato equilibrio Th1/Th2 in cui si verifica uno shift della produzione di citochine type-1 rispetto a quelle

type-2 . In corso di infezione si assiste inoltre inizialmente alla comparsa di cellule T citotossiche specifiche per il virus (CTLs) attivate e successivamente ad un loro aumentato turn-over. Tale dinamica si realizza anche per altri tipi cellulari quali i linfociti B e le cellule natural killer (NK). I CTLs possono inibire la replicazione virale con almeno due meccanismi: direttamente, mediante lisi anticorpo-dipendente delle cellule infette che esprimono sulla loro superficie proteine virali, oppure indirettamente mediante la secrezione, da parte di CTLs attivate il cui TCR riconosce la cellula infetta, di fattori solubili (INF- γ , TNF- α e defensine) e di chemochine (MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES) in grado di inibire la replicazione virale impedendo alla progenie virale liberata di infettare nuove cellule.

In aggiunta a questa risposta cellulo-mediata si realizza anche una risposta immunitaria umorale che può contribuire, seppure in maniera minore, al controllo della viremia attraverso la produzione di anticorpi neutralizzanti diretti contro gli epitopi contenuti nella glicoproteina dell'envelope virale. E' inoltre noto il ruolo protettivo degli anticorpi neutralizzanti di tipo IgA a livello della barriera mucosale. Il ruolo svolto da questo tipo di immunità non è comunque ancora del tutto compreso (Douek DC;2003) .

Negli ultimi anni sempre maggiore importanza si dà a nuove teorie sull'immunopatogenesi dell'HIV. Il decorso dell'HIV viene infatti scisso in due diverse fasi: la malattia acuta e la malattia cronica. Nell'infezione acuta il virus determinerebbe la massima deplezione dei linfociti CD4+CCR5+R0+ (linfociti T memoria effettori che circolano tra organi linfoidi secondari e siti effettori) a livello intestinale. Questo determinerebbe

un'alterazione della barriera mucosale che aumenta la permeabilità ai prodotti microbici.

Indice di traslocazione microbica è il lipopolisaccaride (LPS) ad attività immunostimolatoria. LPS si legherebbe dunque ai Toll Like receptors che stimolerebbero i macrofagi e cellule dendritiche che producono TNF alfa, IL6 ed IL1 beta ad attività pro infiammatoria. E' emerso come LPS sia aumentato nei pazienti HIV positivi e come il livello di LPS sia correlato al grado di attivazione dei linfociti T CD8. Questa continua stimolazione del sistema immunitario viene definita come immunoattivazione e porterebbe ad un continuo reclutamento di CD4 T naive e central memory che si differenziano in CD4+CCR5+R0+ fino all'esaurimento ed al consensuale invecchiamento del sistema immunitario (immunosenescenza). (Brenchley JM,2006).

Immunoattivazione

La valutazione dell'espressione degli antigeni di superficie HLA-DR e CD38 sulle cellule T è usata come marker di immunoattivazione.

HLA-DR è una proteina eterodimerica facente parte del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II. In genere i recettori del tipo MHC svolgono la funzione di presentazione dell'antigene alle cellule del sistema immunitario adattativo. In particolare i recettori MHC di classe II sono implicati nel processo di presentazione dell'antigene alle cellule T CD4+ helper. Dopo che un patogeno extracellulare è stato fagocitato e processato negli endosomi o nei lisosomi piccoli peptidi con funzione di epitopi antigenici vengono associati agli eterodimeri di classe II e trasportati sulla superficie cellulare dove possono essere riconosciuti dai linfociti T

CD4+. Tali linfociti vengono definiti come “classe II ristretti”, perchè riconoscono solo antigeni nel contesto di MHC II. La distribuzione tissutale delle proteine MHC di classe II è limitata alle APC (Antigen Presenting Cells), cioè macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B, che sono specializzate nei processi di presentazione dell'antigene ai linfociti T. Tuttavia la loro espressione può essere indotta su altre cellule, per azione, ad esempio, dell'IFN- γ .

L'espressione aumentata di tale marcatore sulle cellule T è associata ad un recupero subottimale della conta dei Linfociti CD4+ (Nakanjako D et al., 2011). Pazienti cosiddetti discordanti immunologici (bassa conta dei linfociti T CD4+ con viremia stabilmente soppressa) mostrano aumentati livelli di HLA-DR sia nel compartimento CD8+ che CD4+. Anche sulle cellule Tregs (regulatory T cells), definite dal fenotipo CD4+CD25+CD127^{low/-}, è stato trovato un aumento dell'espressione di HLA-DR nei soggetti HIV-positivi, quando confrontati con una popolazione di controllo. Tale incremento era associato in maniera diretta alla carica virale e inversa alla conta dei linfociti T CD4+. Le cellule Tregs sembrano avere una funzione soppressiva sulle risposte specifiche anti-HIV, anche se il loro ruolo rimane dibattuto. Potrebbero da un lato ridurre i livelli di immunoattivazione e dall'altro ridurre la risposta T specifica contro HIV, permettendo al virus di replicare. I pazienti con infezione cronica da HIV definiti “elite controllers” sono soggetti in cui, in assenza di terapia, la viremia di HIV risulta non rilevabile o estremamente bassa. E' stato riscontrato che questi soggetti presentano comunque livelli di immunoattivazione più elevati rispetto ai controlli sani. Un'ipotesi è che in tali individui vi sia una scarsa risposta dei linfociti Tregs, dimostrata dal

fatto che la frequenza di linfociti T con fenotipo regolatorio (CD4+, CD25+, CD127low/-) in tali individui è ridotta rispetto ai controlli sani (Hunt PW et al., 2011).

CD38 è una proteina di membrana cellulare dei leucociti umani, con funzioni recettoriali ed ectoenzimatiche. Le sue funzioni recettoriali sono principalmente di trasduzione del segnale in vie di attivazione e proliferazione. Il suo legame con la gp120 di HIV provoca invece una modulazione dell'ingresso virale nelle cellule bersaglio. Numerose ricerche hanno rivelato che CD38 è un ectoenzima (enzima associato alla membrana cellulare che catalizza reazioni extracellulari) multifunzionale coinvolto nel catabolismo di NAD⁺ e NADP⁺ e generante potenti composti intracellulari Ca²⁺ mobilizzanti. L'espansione del sottogruppo di linfociti CD8⁺CD38⁺ è un'alterazione osservata frequentemente nei soggetti HIV positivi, associata al declino dei linfociti CD4⁺ e alla comparsa di manifestazioni cliniche (Kestens L et al., 1992). CD38 è espresso maggiormente sui linfociti T CD8⁺ citotossici (CTL) specifici per HIV e la percentuale di CD8⁺CD38⁺ è un indice più affidabile di progressione di malattia rispetto alla conta dei CD4⁺ (Liu Z et al., 1997). L'espressione sui linfociti T CD4⁺ di CD38 e CCR5 è stata associata ad una popolazione di cellule fortemente attivate con funzione citotossica che compare dopo l'infezione acuta e tende a scomparire rapidamente, essendo suscettibile all'infezione citopatica del virus e mostrando elevati indici di apoptosi. Alcuni studi hanno dimostrato che l'espressione del CD38 nel compartimento CD4 può essere un marcatore di progressione dell'infezione (Kestens L et al., 1994).

L'inizio della terapia antiretrovirale (HAART: highly active antiretroviral treatment) è seguito da un rapido declino dei linfociti CD8⁺CD38⁺

parallelamente all'abbattimento della carica virale. L'espressione del CD38 sui linfociti T CD8 nei pazienti con infezione da HIV è fortemente associato alla replicazione virale: è stato proposto che la persistente espressione del CD38 sui CD8 dei pazienti in soppressione virologica possa essere un marcatore di viremia residua, non valutabile mediante le metodiche standard per la determinazione del HIV-RNA. Recentemente è stato mostrato come il miglior monitoraggio dei pazienti con infezione da HIV-1 in trattamento HAART sia la determinazione dei linfociti T CD4+, T CD8+ e dei livelli di espressione del CD38 sui monociti (Almeida M et al., 2007).

Immunosenescenza

Durante la vita dell'uomo il sistema immunitario subisce delle profonde modificazioni: da una tollerogenicità del sistema immune fetale si passa ad una reattività immune nel bambino e nell'adulto fino ad una senescenza associata a disfunzionalità nell'anziano.

Durante l'invecchiamento fisiologico dell'essere umano il sistema immunitario, sia nella sua componente innata sia in quella adattativa, subisce delle modificazioni fondamentali. Un aspetto dominante è rappresentato dall'involutione timica. Il timo è un organo mediastinico in grado di produrre linfociti T naive; fisiologicamente il timo va incontro ad una involuzione con il passare del tempo, fino a scomparire quasi completamente all'età di 60 anni. Di pari passo la capacità di generare cellule T naive diminuisce con il passare del tempo (Hakim FT et al., 2005). Anche a livello del midollo osseo si osserva un progressivo invecchiamento dei precursori ematopoietici, con una modificazione dei fattori prodotti dalle

cellule stromali. Tale situazione è testimoniata dallo scarso successo dei trapianti di midollo condotti in persone anziane.

L'involuzione timica fa sì che l'omeostasi linfocitaria venga sostenuta dai linfociti T di memoria, determinando una progressiva diminuzione del numero delle cellule naive a vantaggio di cellule memory, con una concomitante riduzione del repertorio antigenico. Si verifica un accumulo di cellule differenziate in maniera terminale con limitatissime capacità funzionali e proliferative. Tutto l'insieme di questi fenomeni prende il nome di senescenza del sistema immunitario. Nel 1955 Hayflick descrisse il fenomeno che successivamente fu definito come "limite di Hayflick", in base al quale una coltura cellulare primaria di fibroblasti umani poteva andare incontro a 40-60 replicazioni, prima di entrare in una fase di senescenza cellulare. Successivamente è stato dimostrato come vi fosse una correlazione tra la lunghezza dei telomeri (sequenze esameriche ripetute di DNA collocate alle estremità dei cromosomi) e la storia replicativa delle cellule: ad ogni ciclo cellulare la lunghezza dei telomeri diminuisce, causando, dopo ripetuti cicli, instabilità cromosomica, arresto della crescita ed induzione dell'apoptosi. Questo fenomeno è applicabile anche alle cellule del sistema immunitario (Effros RB et al., 1997). Una caratteristica dei linfociti T senescenti è quella di mostrare un fenotipo caratterizzato dalla perdita del marcatore di superficie CD28 e dall'espressione del CD57 (Gamadia LE et al., 2004). Numerosi studi hanno mostrato come l'espressione del CD28 sui linfociti T CD8+ sia frequente nei soggetti giovani e diminuisca con l'invecchiamento. La popolazione di linfociti T CD28-CD57+ mostra una ridotta capacità di proliferazione e di produzione di IL-2, con accorciamento dei telomeri; tutte queste caratteristiche ci

inducono a definire queste cellule come senescenti e differenziate in senso terminale (Papagno L et al., 2004). I linfociti T senescenti mostrano inoltre una ridotta capacità di produrre contemporaneamente più citochine (polifunzionalità).

Il sistema immunitario, quindi, è un sistema dinamico, dipendente dalla rigenerazione dei precursori cellulari ematopoietici e continuamente sollecitato da stimoli esterni ed interni, che ne alterano l'omeostasi. Non è strano quindi che con l'età esso vada incontro a profonde modificazioni, in particolare a carico del sistema dell'immunità adattativa, quello più soggetto a riequilibri e cambiamenti. Clinicamente questo fenomeno si manifesta negli anziani con aumentata suscettibilità sia a nuove infezioni che a riesacerbazioni di infezioni latenti o croniche.

In corso di infezione da HIV le modificazioni del sistema immunitario in senso "senescente" sembrano però apparire precocemente. Questo fenomeno di invecchiamento anticipato delle cellule del sistema immunitario sembra essere in stretta correlazione con il loro stato di attivazione. Infatti l'immunoattivazione delle cellule T determina un aumentato numero di replicazioni cellulari con precoce accorciamento dei telomeri, perdita sulla superficie dei linfociti T dell'espressione del CD28 e presenza dell'antigene di superficie CD57. Inoltre i fenomeni sopra descritti si associano alla perdita del CD100 (proteina necessaria nei processi di riconoscimento dell'antigene presentato dalle APC specializzate e con funzioni co-stimolatorie) e alla secrezione di citochine pro-infiammatorie come IL-1, IL-6 e TNF α (Davalos AR et al., 2010). Tutte queste alterazioni, come precedentemente evidenziato, sono caratteristiche di un fenotipo cellulare senescente e differenziato in senso terminale con esaurimento delle

capacità replicative. Tali alterazioni nel fenotipo dei linfociti T sono precocemente evidenziabili nei soggetti con infezione cronica da HIV. I pazienti HIV positivi, confrontati con la popolazione generale, presentano una ridotta funzione timica, una perdita di cellule T naive, un accorciamento della lunghezza dei telomeri, un aumento di cellule effettrici differenziate in senso terminale (caratteristiche tutte presenti in individui sani che hanno superato il 70° anno di età) e tutti questi fenomeni si osservano anche quando si prendono in considerazione pazienti in terapia HAART con buon controllo della replicazione virale (Le Saux S et al., 2012). Nell'ambito dell'infezione da HIV la stimolazione cronica del sistema immunitario determina un precoce invecchiamento che lo rende più "anziano" di 40 anni (Ferrando-Martinez S. et al, 2011). L'accumulo di cellule senescenti del sistema immunitario è stato correlato ad una serie di condizioni cliniche quali la ridotta risposta ai vaccini negli anziani, alle patologie autoimmuni, alla riduzione del repertorio dei recettori delle cellule T (TCR), alle patologie cardiovascolari e nell'ambito dell'infezione da HIV alla progressione verso la fase di AIDS (Brenchley JM et al., 2003).

La terapia HAART sembra ridurre la percentuale dei linfociti T CD28- e sembra migliorarne la funzionalità. In alcuni soggetti, nonostante la terapia risulti efficace nel sopprimere la replicazione virale, persistono delle alterazioni del sistema immunitario, in senso di senescenza, nel compartimento CD4 e CD8, con incremento delle cellule di memoria effettrici esprimenti il CD57 a discapito della popolazione naive. Tale alterazione sembra essere associata alla morbilità non-AIDS correlata in corso di terapia HAART (Tassiopoulos K et al., 2012;).

Quanto detto dimostra come il sistema immune presenti una capacità rigenerativa limitata che viene esaurita dallo stato di attivazione immunitaria cronico presente nell'ambito dell'infezione da HIV. Ciò determina un invecchiamento precoce del sistema immunitario associato al manifestarsi anticipato di condizioni cliniche tipiche dell'età anziana, quali le patologie cardiovascolari e cerebrovascolari, la compromissione della sfera cognitiva, il danno renale, la riduzione del tono calcico a livello osseo.

Terapia Antiretrovirale

L'introduzione della terapia di associazione HAART nel trattamento dell'infezione da HIV ha radicalmente modificato la storia naturale dell'infezione, riducendo non solo i casi di progressione dei pazienti sieropositivi verso la condizione di AIDS, la loro morbilità e mortalità ma anche l'incidenza delle malattie infettive e neoplastiche ad essa associate e le loro caratteristiche. L'accesso ai farmaci antiretrovirali è infatti la principale discriminante per la prognosi più o meno favorevole dell'infezione da HIV. Nei paesi dove non vi è un largo accesso a tali farmaci la malattia si presenta con tassi di progressione molto elevati e mortalità superiore all'80% contro il 10 % circa di percentuale di progressione riscontrata nei paesi dove la terapia è ampiamente garantita.

Obiettivo principale della terapia antiretrovirale di combinazione consiste nel ridurre la concentrazione di HIV-RNA nel plasma (carica virale o viremia) a valori non determinabili per il maggiore tempo possibile ed il ripristino immunitario che nella maggior parte dei casi ne consegue. L'assunzione della terapia HAART determina però l'insorgenza di effetti collaterali a breve, medio e lungo termine che possono influenzare il

successo della terapia stessa. I farmaci utilizzati nella HAART possono essere classificati in base al loro meccanismo d'azione in:

1. Inibitori nucleosidici / non nucleosidici della trascrittasi inversa
2. Inibitori della proteasi
3. Inibitori della fusione
4. Inibitori dell'integrasi
5. Antagonisti del recettore CCR5

Ognuno di questi gruppi di farmaci agisce ad un differente livello del ciclo di replicazione del virus dell'HIV bloccandone le varie fasi: NNRTI e NRTI bloccando l'azione dell'enzima virale trascrittasi inversa (che converte l'RNA virale in una doppia elica lineare di DNA), PI bloccando l'azione della proteasi virale, enzima necessario a rendere funzionanti le proteine virali appena sintetizzate, il terzo gruppo bloccando la fusione tra la membrana virale e la membrana della cellula ospite e dunque impedendo all'RNA virale di penetrare nella cellula ospite, gli inibitori dell'integrasi bloccando l'enzima integrasi che catalizza l'integrazione del genoma virale, costituito in questa fase del ciclo da una doppia catena di DNA lineare, nel DNA della cellula ospite mediante legame al sito attivo dell'enzima e l'ultimo gruppo di farmaci ARV legandosi selettivamente al co-recettore CCR5 presente sulle cellule umane impedendo al virus HIV1 CCR5 tropico di entrare nelle cellule. Tale classe di farmaci non ha efficacia nei confronti dei virus HIV che utilizzano come co-recettore di ingresso il CXCR4 o verso i ceppi virali dual-type.

In corso di assunzione della terapia HAART vi sono alcuni fattori che possono influenzarne la sicurezza, la tollerabilità e dunque l'efficacia. Tra questi fattori ricordiamo la presenza di condizioni di comorbidità, l'uso

concomitante di farmaci con tossicità crociata e additiva e le reazioni farmacologiche avverse.

Eventi avversi sono stati segnalati virtualmente con tutti i farmaci e sono le ragioni più comuni di passaggio ad un altro trattamento o dell'interruzione della terapia. La suscettibilità a sviluppare reazioni avverse dipende da diverse variabili, alcune legate alle caratteristiche del paziente ed altre alle caratteristiche del farmaco: tra le variabili dipendenti dalle caratteristiche del paziente ricordiamo l'età, il sesso, la costituzione genetica del soggetto, la presenza di comorbidità, lo stato di gravidanza, l'assunzione o l'abuso di sostanze voluttuarie, la contemporanea assunzione di altri farmaci e la loro possibile interazione, ecc., tutti fattori, cioè, in grado di modificare la farmacocinetica della terapia somministrata. Tra le variabili legate al farmaco ricordiamo la posologia, la modalità di somministrazione, la farmacodinamica, ecc. Gli eventi avversi della terapia HAART si manifestano nella maggior parte dei casi come tossicità a lungo termine. Tra i disturbi a breve termine di più frequente segnalazione sono da ricordare le neuropatie correlate all'uso di analoghi nucleosidici, l'iperamilasemia o la pancreatite in corso di trattamento con didanosina, le reazioni da ipersensibilità per l'abacavir, le reazioni allergiche e l'epatotossicità per la nevirapina, i disturbi a carico del sistema nervoso centrale per l'efavirenz, la calcolosi renale, le coliche renali e l'ematuria asintomatica per l'indinavir ed atazanavir, la tossicità epatica per numerosi farmaci, soprattutto quando concomitano infezioni croniche da epatite virale B o C e l'acidosi lattica correlata all'assunzione di NRTI.

Non meno gravi sono gli eventi indesiderati a lungo termine, i cui esempi più eclatanti sono rappresentati dalle alterazioni del metabolismo osseo

culminanti nella comparsa di osteopenia e di osteoporosi e, nei casi più gravi, dall'osteonecrosi dell'anca, dalla lipodistrofia e dalle anomalie a carico del metabolismo lipidico e glucidico. Le alterazioni del metabolismo lipidico sono alla base della ben nota "sindrome lipodistrofica" in corso di terapia HAART la quale si manifesta a livello morfologico come una ridistribuzione del grasso corporeo (aumento di grasso a livello dell'addome e delle mammelle, della colonna dorso-cervicale con aspetto a "gobba di bufalo", comparsa di lipomi e riduzione del grasso a livello del volto, degli arti e dei glutei) ed a livello metabolico con ipertrigliceridemia, ipercolesterolemia, insulino-resistenza, alterata tolleranza al glucosio, diabete mellito di tipo 2, ed iperlattacidemia che si rendono responsabili di un aumentato rischio cardiovascolare. (DHHS;2013)

Aterosclerosi

L'aterosclerosi rappresenta la principale causa di mortalità e di morbidità nei paesi sviluppati. E' una patologia sistemica caratterizzata da un'alterazione strutturale e funzionale della parete delle arterie di grande e medio calibro. E' caratterizzata dalla perdita di resistenza ed elasticità da parte dei vasi, per la presenza di lesioni intimali (placche fibroateromasiche), che vi protrudono ostruendo il flusso sanguigno. L'aterosclerosi è una patologia infiammatoria cronica: la genesi della stria lipidica, la sua evoluzione in ateroma, in placca fibroateromasica ed in placca complicata sono determinati e sostenuti dalla migrazione nella parete vascolare delle cellule infiammatorie mononucleate circolanti (monociti e linfociti). I monociti si differenziano nella placca in macrofagi, fagocitano le LDL modificate, ancorandole con il recettore scavenger (famiglia dei pattern recognition

receptors PRRs) al fine di liberare la parete vasale da queste. Contemporaneamente il Toll-like receptor, presente sulla loro membrana plasmatica, trasmette un segnale attivatore intracellulare che induce il rilascio di citochine, proteasi e molecole vasoattive. I linfociti organizzano invece una risposta infiammatoria a tipo “ipersensibilità ritardata” che porta ad una massiva produzione di citochine quali INF- γ , IL-1, TNF e IL-6. L’IL-6 stimola la produzione di prodotti della fase acuta come proteina C reattiva (PCR), fibrinogeno e amiloide sierica di tipo A, soprattutto al livello epatico. E’ quindi comprensibile come il riscontro di elevati livelli plasmatici di IL-6 e PCR sia considerato indice di attivazione delle placche fibroateromasiche. Le strie lipidiche sono la lesione precoce dell’aterosclerosi. Sono composte da cellule schiumose infarcite di lipidi, non sono significativamente rialzate sul piano intinale e pertanto non causano alcuna alterazione di flusso. Si presentano sotto forma di macule giallastre multiple che tendono a convergere in strie allungate (strie lipidiche). Quest’ultime sono già presenti nell’aorta di alcuni bambini di età inferiore ad 1 anno e in quasi tutti gli adolescenti. Tuttavia non tutte le strie lipidiche sono destinate ed evolvere in placche fibrose; infatti si presentano in maniera omogenea nel sistema vascolare, senza preferire un distretto corporeo ad un altro. Le placche aterosclerotiche invece si sviluppano soprattutto nelle arterie elastiche (aorta, carotidi e arterie iliache) e in arterie muscolari di grande e medio calibro (coronarie e arterie poplitee). In età medio avanzata la placca diviene sintomatica: è andata incontro a rimodellamento e aumento di dimensioni per organizzazione di trombi al suo interno, continua morte e degenerazione cellulare e sintesi di matrice extra-cellulare. Una placca eccentrica può comportare lo sfiancamento della

parete libera vasale, una sua deformazione aneurismatica o la sua rottura. Tale evoluzione è tipica al livello dell'aorta addominale. La sintomatologia dell'aterosclerosi può essere altresì legata all'ischemia di un distretto corporeo, sia acuta sia cronica. L'ischemia acuta, è solitamente più pericolosa della cronica perché non vi è stato il tempo sufficiente ad indurre lo sviluppo di circoli collaterali alternativi in grado di veicolare ossigeno e glucosio ai tessuti. Si verifica nel momento in cui una placca vulnerabile (ricca di lipidi, friabile, calcifica, con un sottile cappuccio fibroso) va incontro a brusche modificazioni della sua configurazione. L'evento acuto più comune è la trombosi causata dall'erosione/ulcerazione dell'endotelio o da una rottura/fissurazione della placca con esposizione al flusso ematico di costituenti altamente trombogeni. In tal caso, possono anche distribuirsi nel torrente circolatorio micro emboli di colesterolo. Annoverata tra gli eventi acuti di placca è la fessurazione che si verifica frequentemente a livello della giunzione del cappuccio fibroso con l'adiacente segmento arterioso, sede di stress meccanici. Altro fenomeno acuto è l'emorragia intrapacca generata dalla lesione di un capillare della spalla. L'ematoma che ne risulta, può determinare l'espansione del suo volume o addirittura una sua rottura. Più raramente il cappuccio fibroso può sollevarsi e disporsi perpendicolarmente al flusso ematico ostacolandolo (flapping). Tra le sindromi coronariche acute riconosciamo l'angina instabile, l'infarto del miocardio e l'ictus cerebri. L'ischemia cronica è dovuta ad una placca vulnerabile, in fase IV della classificazione dell' American Heart Association, che si accresce lentamente e costantemente fino a determinare una stenosi critica del vaso (Herbert C. Stary; 1994). Clinicamente corrisponde ai quadri dell'angina pectoris stabile e dell'encefalopatia ischemica a seconda del distretto

vascolare colpito. I fattori di rischio che predispongono all'aterosclerosi sono stati identificati nel corso di numerosi studi prospettici, tra cui il più importanti lo studio di Framingham (D'Agostino R., 2008). Tra i fattori costituzionali di rischio riconosciamo l'età, il sesso e i fattori genetici. A parità di altri fattori di rischio il sesso maschile è più suscettibile a sviluppare l'aterosclerosi rispetto alle donne; l'IMA e altre manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi sono rare nelle donne in età premenopausale a meno che non presentino una predisposizione legata all'anamnesi di diabete, iperlipidemia o grave ipertensione. Dopo la menopausa, intorno alla settima-ottava decade di vita, a causa probabilmente della riduzione dei livelli degli estrogeni endogeni, la frequenza di IMA non è dissimile nei due sessi. La predisposizione familiare all'aterosclerosi è poligenica. Più frequentemente è legata al concorso di fattori di rischio come l'ipertensione e il diabete, meno comunemente è ascrivibile a definite alterazioni genetiche del metabolismo delle lipoproteine con conseguenti elevati livelli plasmatici di lipidi, come nell'ipercolesterolemia familiare. I quattro maggiori fattori di rischio potenzialmente controllabili sono l'iperlipidemia, l'ipertensione, il fumo di sigaretta e il diabete. Fattori di rischio minori sono l'iperomocisteinemia e l'espressione di una lipoproteina particolare, la Lp(a), un'LDL che possiede la lipoproteina B-100 legata all'Apo A.

Eziopatogenesi

L'eziopatogenesi dell'aterosclerosi non è ancora completamente nota. Un ruolo cruciale è svolto dalle cellule endoteliali che, oltre a regolare la permeabilità intimale e garantire la nutrizione della media vascolare, regolano la fluidità del sangue, la velocità del flusso ematico, modulano

processi immunitari e infiammatori e controllano il rimodellamento della parete vascolare. Già Virchow aveva ipotizzato che un danno endoteliale cronico potesse essere responsabile dello sviluppo dell'aterosclerosi. Il patologo americano Russel Ross è stato il primo agli inizi degli anni novanta a considerare l'aterosclerosi una malattia infiammatoria. A partire da tale assioma ha sviluppato la "teoria della risposta al danno" secondo la quale l'aterosclerosi viene considerata la risposta infiammatoria cronica della parete arteriosa, ad un danno a carico dell'endotelio. L'aterosclerosi può essere definita una malattia infiammatoria in cui meccanismi immunologici insieme a fattori di rischio di natura metabolica determinano l'inizio, l'attivazione e l'aumento delle lesioni nell'albero arterioso (Libby;2002). Riconosciamo due tipologie di danno endoteliale: un danno erosivo ed un danno non erosivo. Per danno erosivo intendiamo una lesione che comporti il denudamento endoteliale. Una simile lesione si realizza a seguito di procedure terapeutiche volte a disostruire un vaso (tromboendoarterectomia, cateterismo vascolare, angioplastica etc...) o a seguito dell'aggressione ad opera del sistema immunitario dell'endotelio, come avviene nella vasculopatia da trapianto. A seguito della deiscenza endoteliale, le piastrine aderiscono all'intima e iniziano a promuovere PDGF (platelet-derived growth factor) che stimola la migrazione e la proliferazione delle fibrocellule muscolari della tonaca media. Ciò comporta uno stato di iperplasia intimale che termina nel momento in cui si ha la riendotelizzazione della lesione. L'iperplasia intimale è la manifestazione caratteristica dell'aterosclerosi accelerata che determina stenosi significative del lume vasale nell'arco di pochi mesi. Numerosi studi condotti su modelli animali hanno riprodotto l'aterosclerosi accelerata soprattutto nei casi in cui

si associava una dieta iperlipidica. Tuttavia le lesioni precoci nell'uomo originano in sedi che presentano un endotelio morfologicamente indenne: nel caso dell'aterosclerosi non accelerata, l'alterazione endoteliale iniziale è esclusivamente di tipo funzionale. La causa specifica della disfunzione endoteliale, che darebbe inizio al processo aterosclerotico, è tuttavia sconosciuta: potenzialmente implicate sarebbero i derivati del fumo di sigaretta che circolano nel torrente ematico, l'omocisteina, alcuni virus e altri agenti infettanti. Si è invece accertato il ruolo fondamentale delle alterazioni emodinamiche e dell'accumulo delle LDL tossiche nell'intima vasale, quali due principali determinanti della disfunzione endoteliale che dirige l'aterogenesi infiammatoria. La rilevanza degli effetti emodinamici nell'induzione del danno vascolare è supportata dalla ben nota tendenza delle placche a svilupparsi soprattutto in corrispondenza degli osti dei vasi che originano dall'aorta, lungo la parete posteriore dell'aorta addominale, ove vi sono alterate condizioni di flusso, e al livello delle biforcazioni vasali. Ulteriore prova anatomica di questo concetto è l'assenza fisiologica di placche ateromasiche nell'arteria polmonare e di un loro sviluppo nei pazienti affetti da ipertensione polmonare. In aggiunta ricordiamo che il flusso ematico laminare ha un ruolo protettivo nei confronti della parete vasale, determinando l'espressione di geni endoteliali (cosiddetti ateroprotettivi) i cui prodotti proteggono i tessuti dal danno ossidativo.

I meccanismi attraverso cui l'iperlipidemia contribuisce all'aterogenesi sono vari. In primo luogo le lipoproteine tendono ad accumularsi nei siti di maggior permeabilità endoteliale e vanno incontro ad alterazioni della loro struttura chimica. Subiscono l'ossidazione sia nella componente proteica, sia in quella lipidica ad opera dei radicali liberi dell'ossigeno secreti dai

macrofagi e dalle cellule endoteliali disfunzionali. Le LDL modificate non possono più essere riconosciute dai normali recettori e si accumulano nell'intima vascolare. Vengono fagocitate dai macrofagi, mediante i recettori scavenger (spazzini), che quindi si trasformano in cellule schiumose. Le LDL sono tossiche per le cellule endoteliali e stimolano la liberazione di fattori di crescita e citochine da parte della componente cellulare della placca. In secondo luogo l'ipercolesterolemia cronica compromette la produzione di NO endoteliale, principale fattore rilassante a rilascio locale, aumentando la produzione dei radicali liberi che lo inattivano. A fondamento della rilevanza patogenetica di un rallentato metabolismo delle LDL è l'evidenza che uno stato di iperlipoproteinemia è sempre associato ad un'accelerazione delle tappe che conducono all'aterosclerosi. Ciò accade nell'ipercolesterolemia familiare omozigote, che spesso esita nell'infarto del miocardio prima dei 20 anni. Tale assunto è stato dimostrato anche in modelli sperimentali di aterosclerosi su animali geneticamente modificati in modo da presentare alterazioni del metabolismo lipidico. In più, dati epidemiologici mostrano correlazione significativa tra gravità dell'aterosclerosi e livelli di colesterolo plasmatico totale o LDL. Le dislipoproteinemie oltre che di origine genetica, possono essere secondarie ad altre patologie come la sindrome nefrosica, l'alcolismo, l'ipotiroidismo, il diabete mellito o essere di origine iatrogena come nei pazienti HIV positivi in terapia antiretrovirale. Le alterazioni emodinamiche e metaboliche attivano le cellule endoteliali e le cellule mononucleate circolanti, innescando uno stato infiammatorio cronico dell'arteria: macrofagi e linfociti vengono reclutati nell'intima vasale grazie alle molecole di adesione vascolare VCAM-1 espresse dall'endotelio. Gli

antigeni responsabili dell'attivazione immunitaria sono diversi: antigeni virali e batterici, proteine dello shock termico (heat shock) e nuovi antigeni derivati da modificazione di molecole self (costituenti della parete vascolare e LDL). I macrofagi della placca producono intermedi reattivi dell'ossigeno, che ossidano le LDL, l'IL-1 e il TNF che incrementano l'adesività dei leucociti, e la Monocyte Chemoattractant Protein-1 che attrae nuovi leucociti. I leucociti attivati e le stesse cellule della parete arteriosa possono rilasciare mediatori fibrinogenici solubili e fattori di crescita peptidici in grado di promuovere la replicazione delle CML (cellule muscolari lisce) e di stimolarle a produrre una densa matrice extracellulare ricca di collagene, caratteristica delle lesioni aterosclerotiche avanzate. La proliferazione delle cellule muscolari lisce è sostenuta dall'FGF, dal TGF- α e dal PDGF, rilasciato anche dalle piastrine aderenti ad una zona in cui l'endotelio è danneggiato. La placca fibroateromasica è la lesione aterosclerotica per eccellenza. Si presenta, all'esame istologico, come un ispessimento circoscritto dell'intima delle arterie di grande e medio calibro, siano esse elastiche (aorta, carotidi, arterie iliache) o muscolari (coronarie, poplitee). E' di consistenza compatta ed il suo colorito va dal bianco al grigio-giallastro a seconda della preponderanza delle due componenti fondamentali: quella fibrosa e quella ateromasica. Sezionando la placca, riconosciamo una porzione centrale gialla (core lipidico), chiamato ateroma per la sua consistenza poltacea (*athere* dal greco significa pappa) e un involucro periferico fibroso di colorito bianco, che circonda l'ateroma formando il cappuccio fibroso della placca sul lato luminale ed in profondità il suo pavimento. In corrispondenza della lesione la tunica media del vaso risulta assottigliata. Al livello microscopico l'ateroma è costituito da lipidi

in forma anista o cristallina (colesterolo e esteri del colesterolo), detriti cellulari e proteine plasmatiche. Le fibre collagene ed elastiche, sintetizzate dalle fibrocellule muscolari lisce attivate, e i glicosaminoglicani costituiscono la componente fibrosa. Ai bordi dell'ateroma, sotto il cappuccio fibroso, si trova la spalla della placca dove alloggia la componente cellulare: macrofagi schiumosi lipofagici (di origine monocitaria o miogenica), linfociti T, fibrocellule muscolari lisce, macrofagi pigmentati e rare cellule giganti mononucleate. In quest'area è inoltre presente una quota di neovascolarizzazione dove proliferano numerosi capillari e possono verificarsi microemorragie. L'ateroma si riscontra più comunemente al livello dell'aorta addominale ed in ordine decrescente nei seguenti distretti: arterie coronarie, femorali, poplitee, carotidi interne, vasi della parte posteriore del poligono di Willis, arterie mesenteriche e renali.

Aterosclerosi ed HIV

Prima dell'avvento della terapia antiretrovirale (ART) a determinare la morte dei pazienti HIV positivi erano le superinfezioni e le patologie neoplastiche secondarie allo stato di profonda immunodeficienza che si instaurava. Dopo l'introduzione dell'ART si è assistito ad un cambiamento rivoluzionario che ha portato da un lato ad un aumentata aspettativa di vita ma dall'altro lato sono sicuramente aumentati i problemi collegati ad essa ed in particolar modo legato agli effetti collaterali. Tra questi sicuramente quello ad impatto maggiore è l'aumentato rischio cardiovascolare diventato la più importante causa di morte per tali pazienti.

Era già noto come l'uso dei PIs comportasse l'incremento del colesterolo totale e LDL ed la riduzione del colesterolo HDL. Dunque l'equazione semplicistica formulata fu: dislipidemia farmaco-indotta uguale aumentato rischio di malattia coronarica acuta. Questa visione, assolutamente parziale, fu confutata da numerosi studi e dalla migliore conoscenza della patogenesi dell'aterosclerosi, per molti anni considerata, come il suffisso -osi testimonia, un fenomeno prevalentemente degenerativo.

Currier e al., studiando un campione di 28513 pazienti HIV+ e 3083209 controlli sani, hanno dimostrato che l'incidenza di patologia coronarica su base ischemica (CHD Coronary Heart Disease) era significativamente maggiore nei giovani adulti tra i 35 e i 44 anni infettati dal virus. Uno studio condotto da Triant e al. ha dimostrato che l'incidenza di infarto del miocardio (MI myocardial infarction) era dell'11.13 % nei pazienti HIV+ contro il 6,98 % della popolazione generale con un RR di 1.75 ($P < 0.0001$), valore che aumentava nelle donne. Tale studio ha dimostrato inoltre una più elevata prevalenza di fattori di rischio di tipo metabolico nella corte di pazienti malati, standardizzato per sesso ed età ($P < 0.0001$ per ogni dato): ipertensione (21% vs 15.9%), diabete (11.5% vs 6.6%) e dislipidemia (23.3% vs 17.6%) (Grinfeld C, 2009).

Il ruolo della ART nell'incrementare il rischio cardiovascolare dei pazienti HIV positivi è stato provato da numerosi studi ed in particolar modo dallo studio D.A.D. che ha osservato per sei anni una coorte di 23437 pazienti HIV positivi in terapia in 21 paesi per documentarne gli effetti collaterali. Il rischio relativo per patologia cardiovascolare è risultato pari all'1.16% annuo per i pazienti trattati con gli inibitori delle proteasi (PIs) e dell' 1.05% annuo per quelli trattati con inibitori non-nucleosidici della trascrittasi

inversa (NNRTI). Tale rischio era cumulativo: aumentava in maniera direttamente proporzionale alla durata della terapia.

Il maggior rischio di infarto del miocardio associato all'uso di inibitori delle proteasi non era però spiegabile esclusivamente alla luce della dislipidemia che generano.

Un'ulteriore analisi dei dati dello studio D.A.D. inoltre evidenziava come l'uso recente (<di 6 mesi) di due inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI, abacavir o didanosina) era associato ad un incremento del rischio di MI rispettivamente del 90% e del 49%. L'alterazione metabolica conseguente all'ART è una condizione nota da tempo e denominata lipodistrofia. Si tratta della contemporanea presenza di uno stato di insulino resistenza, di dislipidemia e di alterazione della ridistribuzione del grasso (incremento relativo del grasso viscerale e perdita del grasso sottocutaneo), dovuta soprattutto ad una terapia a base di due NRTIs e un IP.

Gli PIs esplicano inoltre un'azione diretta a danno delle cellule endoteliali in quanto inibiscono l'eNOS (ossido nitrico sintetasi endoteliale) e quindi la produzione di ossido nitrico, importante sostanza vasodilatatrice e antinfiammatoria. Per comprendere il peso specifico che la durata della ART aveva sull'incremento del rischio aterosclerotico nei pazienti HIV positivi era stato organizzato uno studio comparativo tra due coorti: la prima costituita da pazienti in terapia continuativa ARV, la seconda formata da pazienti che assumevano la terapia in maniera intermittente, solo quando la conta dei LT-CD4+ scendeva sotto le 250 cellule/mm³. Tale studio è stato interrotto a causa dell'aumentato tasso di mortalità e dell'incremento del rischio di progressione nei pazienti arruolati nella seconda coorte. Ciò ha evidenziato che solo un regime terapeutico continuativo permette di gestire

in maniera ottimale la patologia e che i farmaci devono essere scelti con attenzione, sulla base del rischio cardiovascolare specifico di ciascun paziente.

E' giustificato quindi intraprendere strategie preventive al fine di gestire in maniera ottimale i fattori di rischio cardiovascolare: si raccomanda di ottenere un buon profilo lipidico prima dell'inizio dell'ART o entro 3-6 mesi dall'introduzione di un nuovo regime terapeutico, mediante accorgimenti dietetici, sane abitudini di vita o una terapia medica.

E' consigliabile inoltre modificare il regime iniziale ARV, al fine di preservare un buon profilo lipidico e scongiurare l'insulino resistenza, sostituendo un PI con un NNRTI mentre tra gli stessi IP atazanavir e saquinavir sono quelli che meno modificano negativamente i fattori metabolici di rischio cardiovascolare.

Lo studio istologico delle placche ateromasiche di pazienti HIV positivi ha dimostrato inaspettatamente una lesione a carattere infiammatorio con ricca componente linfocitaria. Uno studio italiano si è proposto di analizzare le differenze morfologiche delle placche carotidee di questi pazienti, sfruttando la metodica ultrasonografica e ne sono state esaminate le seguenti caratteristiche: l'ecogenicità rispetto alle pareti del vaso, la presenza di coni d'ombra, l'omogeneità, il profilo endoluminale e l'assenza di un piano di clivaggio tra l'intima la media e gli stati sottostanti. Le lesioni nei pazienti HIV erano differenti rispetto a quelle dei soggetti sani poiché presentavano lesioni di tipo artritico iso/ipoecogene senza coni d'ombra vista la componente cellulare. Ciò è in contrasto con il tipico aspetto non omogeneo delle placche ateromasiche composte di tessuto cellulare e non cellulare, materiale fibroso, lipidico e calcifico.

Altra differenza morfologica è il piano di clivaggio intinale: ben evidente nell'ateroma classico, generalmente assente nelle lesioni simil-arteritiche che coinvolgono la parete vascolare a tutto spessore. In ultimo, una caratteristica tipica dell'ateroma è l'aspetto friabile, irregolare e frequentemente ulcerato all'indagine ecografica, caratteristiche tutte che determinano il rischio di distacco di emboli dalla placca. Al contrario, la superficie liscia delle lesioni nei pazienti HIV-positivi e l'assenza di ulcerazioni ne suggeriscono il basso potenziale di embolizzazione.

Negli ultimi anni gli hanno mostrato il ruolo dell'infiammazione vasale ed il danno endoteliale nei pazienti HIV-positivi. Questi presentano difatti un'elevata concentrazione ematica di marcatori dell'infiammazione: quali PCR, fibrinogeno, IL6, D-dimero oltre che un'elevata concentrazione di ICAM-1 e VCAM-1, indicatori di uno stato di attivazione endoteliale. Due sembrano essere i principali meccanismi del danno infiammatorio: l'azione diretta del virus e gli eventi immunoricositutivi che sembrano predisporre alla comparsa di lesioni precoci.

Il virus è poi in grado di infettare le cellule endoteliali, che esprimono a bassi livelli il CCR5, causandone l'attivazione e i macrofagi residenti nella placca, in modo da comprometterne il funzionamento e da causare l'accumulo di LDL-ossidate nell'intima vascolare. (Hakeem A.2010; Coll B; 2007).

SISTEMA RANK/RANKL/OPG

RANKL

RANKL è una proteina che fa parte della superfamiglia del TNF espressa dagli osteoblasti e da alcune cellule del midollo osseo. Oltre ad essere fattore di differenziazione osteoclastico, è responsabile della maturazione delle cellule dendritiche e regola la risposta immunitaria T-dipendente. Un singolo gene codifica la proteina RANKL, tuttavia lo splicing alternativo ne determina tre isoforme. Due isoforme sono glicoproteine transmembrana tipo 2 mentre la terza isoforma è costituita da 243 aminoacidi, manca del dominio trans membrana e citoplasmatico, e funge da ligando solubile. L'espressione di RANKL negli osteoblasti è indotta da varie citochine (IL-1, IL-11 e $\text{TNF}\alpha$) ed ormoni per tale motivo nominati calciotropi (vit D3, PTH e prostaglandine E2). L'aumentata espressione di RANKL da parte degli osteoblasti determina il differenziamento, l'attivazione e l'inibizione dell'apoptosi degli osteoclasti con il conseguente riassorbimento osseo. La produzione di RANKL da parte delle cellule T induce gli osteoclasti a produrre $\text{INF-}\beta$, che agisce in maniera autocrina bloccando la proliferazione ed il differenziamento degli stessi. Il meccanismo di down-regolazione mediato dall' $\text{INF-}\beta$ può essere amplificato dalla contemporanea produzione di $\text{INF-}\gamma$ da parte degli osteoclasti stessi e delle cellule NK. L' $\text{INF-}\gamma$ inibisce il segnale RANKL-mediato. Tuttavia l'azione dell' $\text{INF-}\gamma$ nel rimodellamento osseo è ancora da definire: è accertato il suo ruolo di modulatore negativo dell'osteoclastogenesi, ma pare anche aumentare la proliferazione degli osteoclasti in colture cellulari di pazienti affetti da

osteopetrosi. Sembra quindi che gli effetti dell'INF sugli osteoclasti sia duplice e dipenda dalle specifiche condizioni del microambiente osseo e dalla concentrazione delle altre citochine che possono influire sulla differenziazione dei precursori osteoclastici. (Fig.1)

Mutazioni del gene RANKL sono responsabili di osteopetrosi.

RANKL è inoltre espresso dalle cellule stromali del midollo osseo ed è in grado di aumentare la sopravvivenza e la replicazione delle cellule dendritiche, è espresso dai linfociti B, dalle cellule del timo, le cellule epiteliali delle ghiandole mammarie durante la gravidanza e l'allattamento dove è necessario per l'iperplasia cellulare che tali condizioni determinano, dalle cellule sinoviali in corso di infiammazione come ad es. nell'artrite reumatoide partecipando ai processi destruenti a livello articolare, inducendo la proliferazione dei precursori degli osteoclasti all'interno del midollo osseo promuovendone la compartimentalizzazione al livello articolare e la loro unione in osteoblasti.

RANKL è infine espresso a livello polmonare ed è implicato nella proliferazione di alcune cellule tumorali che esprimono anche RANK e ne guida la metastatizzazione ossea.

RANK

Rank è stata scoperta da Anderson e collaboratori. E' una glicoproteina trans membrana tipo 1, costituita da 616 aminoacidi e membro della famiglia del tumor necrosis factor receptor (TNFR). L'espressione di RANK è stata trovata sulla superficie di numerose cellule: precursori osteoclastici, osteoclasti maturi, cellule dendritiche, cellule epiteliali della ghiandola mammaria, cellule del tumore della mammella e del tumore della

prostata. RANK viene attivato dal legame con RANKL iniziando così la cascata di segnali attraverso TRAFs , in particolar modo TRAF6, che attiva l'NF-kB, c-jun N-Terminal Kinase o src determinando la differenziazione di monociti in osteoclasti e l'attivazione di osteoclasti maturi.

OPG

OPG è una glicoproteina appartenente anch'essa alla famiglia dei TNFR , così denominata per l'effetto protettivo sull'osso (dal latino os: osso e proteggere: proteggere). E' una glicoproteina solubile secreta da numerose cellule mesenchimali come osteoblasti e cellule stromali del midollo osseo. A differenza di RANK e RANKL, OPG non presenta domini trans membrane e citoplasmatici. Agisce come decoy receptor legandosi con alta affinità a RANKL prevenendo il legame con RANK. In tal modo inibisce la differenziazione, l'attivazione e la sopravvivenza degli osteoclasti. Il rilascio di OPG viene mediato da vari regolatori metabolici: viene aumentato da IL-1, TGF- β e TNF- α mentre viene diminuito da PTH, PGE2 e 1,25D3. E' stato osservato inoltre un legame di OPG con TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) ma con una minore affinità rispetto a RANKL. TRAIL si lega a specifici recettori (TRAIL DR4 e TRAIL DR5) sulla superficie delle cellule che contengono domini di morte nel citoplasma in seguito a tale legame trasduce il segnale apoptotico. Il significato del legame tra OPG e TRAIL rimane non chiaro.

Regolazione molecolare dell'osteoclastogenesi

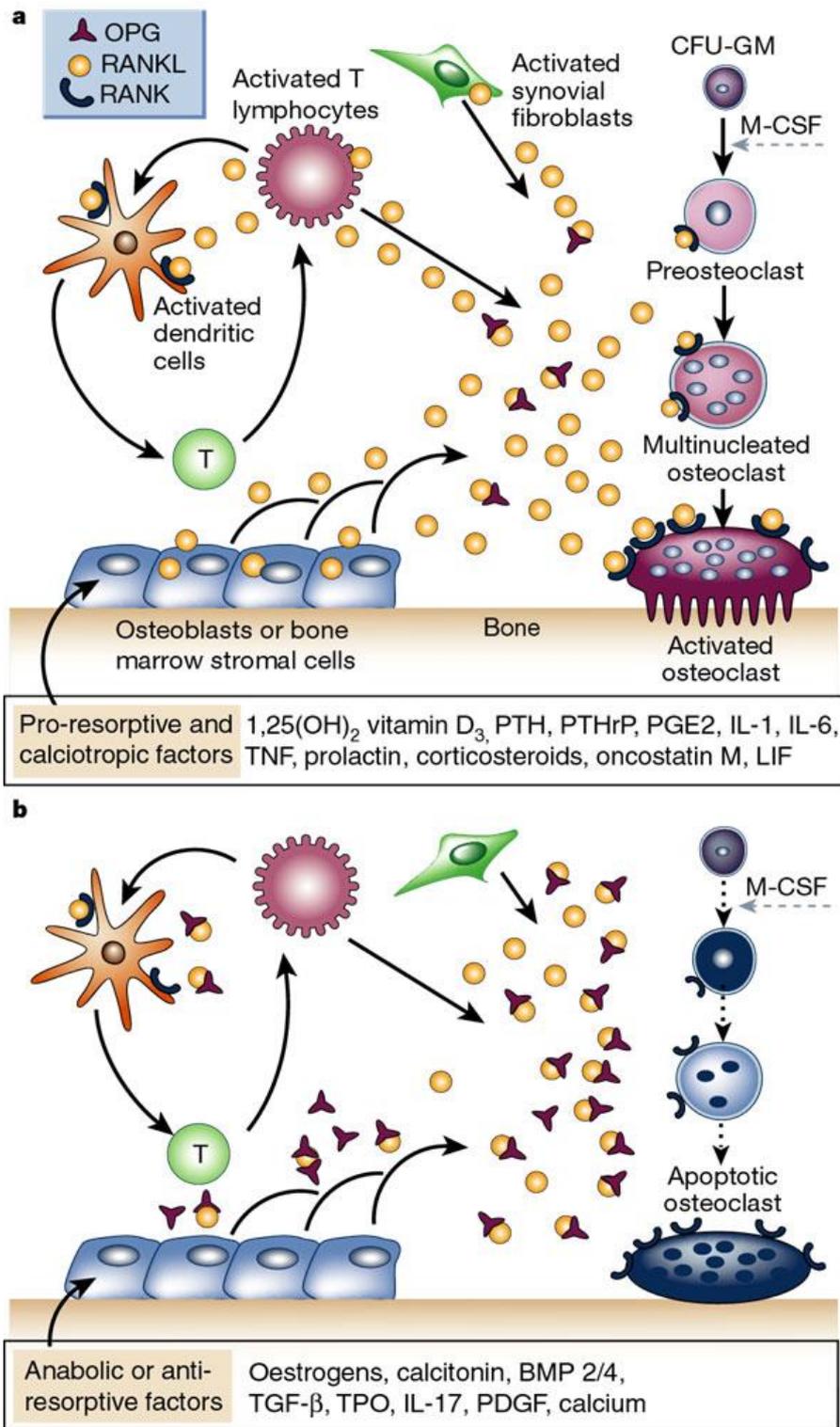


Fig 1: regolazione ormonale dell'osteoclastogenesi. www.nature.com

I fattori calciotropi inducono l'espressione di RANKL sugli osteoblasti il quale, una volta espresso, si lega al suo recettore RANK presente sia sulle cellule midollari della linea monocito-macrofagica, sia sulle cellule progenitrici degli osteoclasti sia, infine, sugli osteoclasti stessi. Una volta formatosi il complesso RANK/RANKL induce, in presenza di concentrazioni permissive di M-CSF, il reclutamento, la differenziazione, la maturazione e l'attivazione degli osteoclasti e quindi, in ultima analisi, il riassorbimento osseo. L'OPG agisce come recettore solubile ed una volta prodotta dagli osteoblasti si lega a RANKL occupando il sito di legame per RANK e dunque inibendo il riassorbimento osseo. Il fattore di crescita trasformante β (TGF- β) stimola la produzione osteoblastica di OPG ed è stato ipotizzato che la sua liberazione, che avviene durante la fase di riassorbimento osseo, funga da feedback positivo stimolando la produzione e la liberazione di OPG. Anche il 17- β -estradiolo induce la produzione osteoblastica di OPG e questo potrebbe spiegare la genesi dell'osteoporosi post-menopausale.

Concludendo possiamo affermare che l'equilibrio tra RANK, RANKL ed i livelli di OPG regolano lo sviluppo e l'attivazione degli osteoclasti e dunque il rimaneggiamento osseo. Inoltre tutti i fattori calciotropi agiscono modificando la produzione di queste tre molecole. Unica eccezione è rappresentata dalla calcitonina la quale agisce con meccanismo indipendente attraverso il proprio recettore osteoclastico. (Stejskal D;2001; Wright HL., 2009;Boyce Brendan F 2008).

RANKL/RANK/OPG:

sistema immune e vascolare

Diversi studi hanno proposto un ruolo di OPG e di RANKL nella regolazione del sistema immunitario vista l'espressione di OPG sui linfociti B, T CD4+ e sulle cellule dendritiche all'interno dei linfonodi e l'espressione di RANKL sui linfociti T attivati e non. Chakravarti e coll. hanno dimostrato una produzione di OPG sia spontanea che inducibile da parte dei linfociti T che rappresenterebbe un meccanismo per mantenere l'omeostasi e per compensare la produzione di RANKL e TRAIL dai linfociti T attivati. La produzione di OPG dai linfociti T è ristretta ai linfociti T CD4+ e verrebbe regolata da numerosi fattori quali IL-4, IL-1 β , TNF- α , GM-CSF e la vitamina D3. Si è osservato come alti valori di linfociti T CD4+ siano associati ad una bassa attività osteoclastica. I linfociti T attivati hanno la capacità di sopprimere l'osteoclastogenesi attraverso la produzione di INF- γ che interferisce con il legame RANK-RANKL attivando la degradazione di TRAF6. Tuttavia solo i CD4+ e non i CD8 hanno la capacità di produrre citochine inibitorie l'osteoclastogenesi come INF- γ e GM-CSF. E' stato inoltre osservato una forte riduzione della produzione di OPG dai linfociti T in corso di HIV per l'azione della gp-120 e per l'azione della terapia antiretrovirale, in particolar modo dei PI. Si è visto per l'appunto come la gp-120 e la terapia con PI aumentino l'espressione di RANKL sui linfociti T. Inoltre la diminuzione della produzione di OPG nei pazienti HIV positivi può essere spiegata con una riduzione dell'attività neutralizzante svolta da TRAIL e da un conseguente potenziamento dell'attività apoptotica di TRAIL sui linfociti T CD4+.

Recenti studi hanno dimostrato come OPG venga espressa sulle cellule dendritiche. Queste ultime, come noto, sono cellule presentanti l'antigene che regolano l'immunità attraverso l'attivazione dei linfociti B e T naive e mantenendo la tolleranza delle cellule T verso i self antigens. Si differenziano in plasmacitoidi CD123+ e mieloidi CD11+. OPG espresso sulle cellule dendritiche regola negativamente la linfopoiesi delle cellule B, altera l'interazione delle cellule dendritiche con i linfociti B ed influenza la magnitudo della risposta T nei linfonodi. Recenti studi mostrano come le cellule dendritiche esprimano OPG che regola a sua volta la sopravvivenza delle cellule dendritiche, la chemiotassi dei monociti e lo sviluppo dei linfociti B attraverso il legame con RANKL. OPG è espresso sulle cellule dendritiche mature e non su quelle immature e l'espressione è una funzione dello stato di maturazione delle cellule dendritiche.

Si è parlato di come OPG sia ampiamente espresso su una varietà di tessuti e cellule, includendo anche il cuore e le arterie. E' emerso come il sistema RANKL/RANK/OPG sia implicato nella calcificazione vascolare, nella microangiopatia diabetica, nello sviluppo dell'aneurisma aortico, nell'aterosclerosi e nella formazione della placca. Molti studi hanno proposto un'associazione tra aterosclerosi, calcificazione vascolare ed osteoporosi. Questo è stato supportato dal riscontro dell'espressione di fattori di trascrizione osteoblastica sulle cellule del muscolo liscio dell'endotelio vascolare calcificato. Studi sperimentali hanno mostrato la presenza di depositi di calcio nell'aorta e nelle arterie renali in topi knockout per OPG con un'augmentata espressione di RANK/RANKL.

OPG è espresso nella parete arteriosa dalle cellule muscolari lisce e nelle cellule endoteliali.

Recentemente è stato identificato un ruolo del sistema RANKL/RANK/OPG nell'aterosclerosi vascolare e precisamente nel processo di stabilizzazione della placca ateromastica.

RANKL può essere prodotto dalle cellule endoteliali stimulate da citochine infiammatorie, da linfociti T attivati reclutati nel tessuto e da cellule muscolari lisce vascolari. Attraverso il legame con il recettore RANK, RANKL può contribuire al processo aterosclerotico inducendo la neoangiogenesi, stimolando l'attività della MMP-9 monocitaria, la trasmigrazione attraverso la membrana basale delle cellule endoteliali e la loro trasformazione in osteoclasti ed infine promuovendo la differenziazione osteoblastica e la conseguente calcificazione delle cellule muscolari lisce vascolari. OPG è costitutivamente prodotta dalle cellule muscolari lisce vascolari e può essere indotta da modulatori infiammatori e down-regolata da stimoli anti-infiammatori. OPG induce la sopravvivenza delle cellule endoteliali antagonizzando l'effetto pro-apoptotico di TRAIL iperespresso dalle cellule muscolari lisce vascolari aterosclerotiche. Alti livelli di OPG possono avere un effetto protettivo sulle arterie danneggiate e sulla calcificazione vascolare non è invece chiaro il ruolo sulle cellule muscolari lisce vascolari.

Partendo dalla medesima ipotesi patogenetica, inoltre, è stato accertato un ruolo di RANKL/OPG nella fibrosi miocardica. La fibrosi miocardica deriva da un eccessivo accumulo di collagene nel miocardio, a causa di un alterato equilibrio tra la sua sintesi e la sua degradazione. Tale attività è regolata dall'equilibrio vigente tra metallo proteinasi di matrice (MMP) ed il loro inibitore tissutale delle metallo proteinasi (TIMP). Il rapporto tra MMP/TIMP è elevato in corso di fibrosi miocardica. Alcune citochine

regolano questo sistema ed in particolar modo la IL-17 che stimola i fibroblasti cardiaci a secernere MMP-1,-2,-3,-9 e -13. L'IL-17 può inoltre stimolare RANKL/OPG che risulta aumentato in corso di fibrosi miocardica che a sua volta induce il sistema MMP/TIMP fungendo quindi da intermediario. (Hofbauer L. C., 2004; Kiechl S., 2006; Collin-Osdoby P 2004)

PARTE SPERIMENTALE

OBIETTIVI DELLO STUDIO

E' ormai accertata una maggiore prevalenza di aterosclerosi ed un aumentato rischio cardiovascolare in corso di infezione da HIV. Oltre ai fattori di rischio tradizionali (età, fumo di sigaretta, diabete mellito, dislipidemia etc), il virus, la terapia antiretrovirale, l'immunoattivazione e l'immunosenescenza giocano un ruolo centrale nel danno vascolare.

Vista l'importanza sempre maggiore attribuita nel corso degli anni all'immunoattivazione nella patogenesi dell'infezione da HIV, sono stati proposti diversi markers rilevabili nel plasma dei pazienti con infezione da HIV, che correlano con lo stato di infiammazione cronica. Oltre ai convenzionali marcatori quali Proteina C-reattiva, D-dimero, IL6 , stanno emergendo nuovi marcatori come l'osteoprotegerina (OPG) membro della superfamiglia del TNF. In primis implicato nel metabolismo osseo inibendo l'osteoclastogenesi, è emerso come abbia un ruolo anche nella calcificazione vascolare, nell'aterosclerosi e nella formazione della placca. In aggiunta ai markers solubili rilevabili nel plasma, altro parametro utile per monitorare lo stato di attivazione del sistema immunitario nel corso dell'infezione da HIV è dato dalla percentuale di linfociti che esprimono sulla loro superficie markers come HLA-DR e CD38. Nel corso dell'infezione da HIV si viene ad instaurare, dunque, un globale deterioramento del sistema immunitario, che mostra delle caratteristiche simili alle alterazioni riscontrabili nel corso dell'invecchiamento, che prendono il nome di "immunosenescenza". Tra i marcatori di senescenza dei

linfociti T CD4+ e CD8+ emergono il CD28 ed il CD57. Da questa premessa sono stati condotti due studi.

Obiettivo del primo studio è stato quello di valutare:

- la prevalenza della patologia cardiovascolare attraverso il grado di stenosi coronarica misurata mediante TC cuore in soggetti con infezione da HIV in terapia antiretrovirale;
- le concentrazioni plasmatiche dell'Osteoprotegerina ed il suo ruolo nella patogenesi del danno vascolare rispetto a marcatori noti come IL-6.

Obiettivo del secondo studio è stato quello di valutare:

- la prevalenza della patologia cardiovascolare attraverso la misurazione dell'ispessimento della intima a livello della carotide destra e sinistra in soggetti con infezione da HIV in terapia antiretrovirale;
- le concentrazioni plasmatiche di Osteoprotegerina;
- il ruolo dell'immunoattivazione e dell'immunosenescenza nella popolazione suddetta mediante la determinazione di HLA-DR, CD38, CD28 e CD57.

MATERIALI E METODI

Popolazione in studio

I STUDIO

E' stato preso in considerazione un campione di 35 pazienti che afferiscono al servizio di Day Hospital della I Divisione Universitaria di Malattie Infettive del Policlinico "Umberto I" di Roma con infezione da HIV accertata ed in terapia antiretrovirale da almeno 48 settimane con Framingham score <10. Come controllo, è stato considerato un campione di 21 soggetti HIV negativi Framingham score <10 e 20 soggetti HIV negativi con Framingham score >10. I campioni di plasma sono stati raccolti nel periodo intercorrente tra Ottobre 2010 e Settembre 2012 durante i controlli cui i pazienti routinariamente si sottopongono. Tutti i prelievi sono stati effettuati previo consenso informato del soggetto.

II STUDIO

E' stato preso in considerazione un campione di 39 pazienti che afferiscono al servizio di Day Hospital della I Divisione Universitaria di Malattie Infettive del Policlinico "Umberto I" di Roma con infezione da HIV accertata ed in terapia antiretrovirale da almeno 48 settimane. E' stato considerato un campione controllo di 24 soggetti HIV negativi comparati per età e per sesso. I campioni di plasma sono stati raccolti nel periodo intercorrente tra Gennaio 2012 e Settembre 2012 durante i controlli cui i pazienti routinariamente si sottopongono. Tutti i prelievi sono stati effettuati previo consenso informato del soggetto.

ESAMI STRUMENTALI

TAC CUORE e CORONAROGRAFIA

La gravità della malattia cardiovascolare è stata valutata in 35 pazienti HIV positivi con un basso dosaggio prospetticamente ECG-triggered CT angiografia coronarica protocollo con 64 strati multi-rivelatore scanner MDCT (Somatom Definizione Siemens Solution medica, Forchheim, Germania). I dataset MDTC sono stati trasferiti e analizzati attraverso una workstation dedicata cardiaco (Vitrea 2.6; immagini vitali, Stati Uniti d'America). Secondo l'American Heart Association (AHA) per l'analisi è stato adottato come modello la segmentazione arterie coronarie e tutti i segmenti con un diametro ≥ 1 mm alla loro origine sono stati inclusi. Il grado di stenosi del lume è stata classificata come lieve (grado I: 30-49 %) moderata (grado II: 50-69%), grave (grado III: 70-99%) od occlusione coronarica (grado IV: 100%). Tutti i pazienti con stenosi significativa a MDTC sono stati considerati per angiografia coronarica. Questa è stata eseguita usando la tecnica standard con angiografia valutati dall'operatore a conoscenza dei risultati MDTC. Una stenosi significativa è stata definita da una riduzione del diametro $> 70\%$. I pazienti con stenosi emodinamicamente significativa sono stati sottoposti a coronarografia in accordo alle linee guida vigenti. Nei pazienti HIV negativi, è stato effettuato elettrocardiogramma basale e sotto sforzo nel caso in cui si osservavano modificazioni del tracciato veniva eseguita la TC cuore ed in presenza di stenosi emodinamicamente significative effettuavano la coronarografia.

ECOCOLORDOPPLER

I 39 pazienti HIV positivi in studio ed i 24 soggetti HIV negativi sono stati sottoposti ad ecodoppler della carotide bilateralmente con misurazione dello spessore dell'intima carotidea a ds e a sn ad 1 cm dal bulbo. L'esame è stato effettuato con macchina Esaote ed è stata condotta con modalità "blinded operator".

Determinazione di IL6 ed OPG

Le concentrazioni plasmatiche di IL-6 sono state misurate con kit ELISA (eBioscience bender MedSystem, Inc Vienna,Austria) con limite di rilevazione di 3,1 pg/ml. Le concentrazioni plasmatiche di OPG sono state misurate mediante kit ELISA (Biomedica Gruppe ,Vienna Austria) con limite di rilevazione di 0.12 pmol/l. La concentrazione dei campioni in esame è stata ottenuta mediante costruzione di una curva standard di riferimento misurando l'assorbanza a 450 nm e calcolando i risultati da questa curva standard mediante interpolazione a 4 parametri.

Immunoattivazione ed Immunosenescenza

Per l'analisi dell'attivazione e della senescenza dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ sono stati utilizzati i seguenti mAbs: Pacific Blue-CD3 (Biolegend, 500 µL), FITC-CD28 Biolegend, 2 mL), PE-CD57 (Biolegend, 2 mL), PerCp/Cy5.5-HLA DR(Biolegend, 500 µL), Pe/Cy7-CD8 (Biolegend, 2 mL), APC-CD38 (Biolegend, 2 mL), APC/Cy7-CD4 (Biolegend, 2 mL). Per la calibrazione del citofluorimetro sono state utilizzate le biglie di calibrazione MACSQuant™ Calibration Beads. Per la compensazione automatica del

citofluorimetro sono state utilizzate biglie marcate (BD™ CompBeads Anti-Mouse Ig, k) e biglie non marcate (BD™ CompBeads Negative Control (FBS)). Per la lisi dei globuli rossi è stata usata la soluzione lisante FACS Lysing Solution. Per l'analisi citofluorimetrica è stato utilizzato il citofluorimetro MACSQuant Analyser ed i dati sono stati analizzati utilizzando il software FlowJo V10. Per determinare lo stato di attivazione e di senescenza dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ è stato utilizzato, per ciascun campione, un solo tubo da FACS al quale sono stati aggiunti 50 µl di sangue intero. Successivamente, è stata effettuata la colorazione con una miscela di anticorpi monoclonali contenente: Pacific Blue-CD3 0,750 µl, APC/Cy7-CD4 3 µl, Pe/Cy7-CD8 3 µl, PerCp/Cy5.5-HLA DR 0,500 µl, APC-CD38 3 µl, FITC-CD28 3 µl, PE-CD57 3 µl. Dopo un periodo di incubazione di 20 minuti, a temperatura incubare a 4°C ed al buio, sono stati aggiunti 500 µl di soluzione lisante BD Lysing Solution 1X (precedentemente diluita e portata a temperatura ambiente) e, una volta trascorsi 10 minuti di incubazione, effettuare un lavaggio con 1 mL di PBS/FCS-10%/(NaN₃ 0,1%), centrifugando a 350xg per 5 minuti, decantare il sovrantante e risospendere il pellet con 200 µL di PBS/FCS-10%/(NaN₃ 0,1%) infine passare all'acquisizione al citofluorimetro. Prima dell'acquisizione, è stato necessario effettuare la calibrazione e la compensazione automatica. La calibrazione è stata effettuata utilizzando 1 tubo da FACS al quale è stata aggiunta una goccia di Calibration Beads. La compensazione automatica prevede, invece, l'utilizzo di 8 tubi da FACS, ciascuno contenente 1 goccia di biglie marcate, 1 goccia di biglie non marcate, 5 µl di anticorpo monoclonale e 400 µl di PBS. In 7 degli 8 tubi da FACS utilizzati viene aggiunto un solo anticorpo per ciascuna delle 7 fluorescenze utilizzate (PB,

APC/Cy7, PE/ Cy7, PerCP/ Cy5.5, APC, PE, FITC) mentre l'ultimo serve come controllo negativo, in quanto non contiene alcun anticorpo monoclonale. Per identificare le diverse popolazioni cellulari è stata usata la seguente strategia di gating: è stato costruito un Gate P1 che identifica i linfociti CD3+, sul Gate P1 sono stati creati i Gates P2 e P3, che delimitano, rispettivamente, i linfociti T CD4+ e CD8+. Infine, sui Gates P2 e P3, sono stati costruiti 4 Gates considerando la positività o meno per i marcatori HLA-DR e CD38 e 4 gates considerando la positività o meno per i marcatori CD28 e CD57. Sulla popolazione di linfociti T CD4+ e CD8+ che esprimono i marcatori di immunoattivazione HLADR e CD38 è stato valutato il grado di immunosenescenza tramite la valutazione dell'espressione delle molecole di superficie CD28 e CD57.(Fig.2)

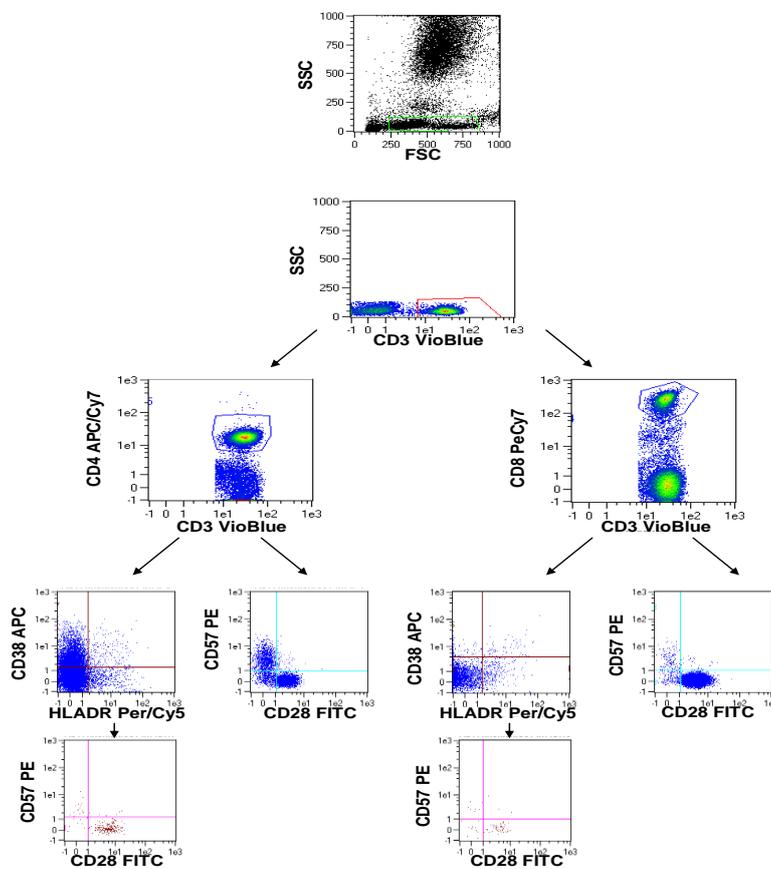


Fig.2. Strategia di gating per identificazione popolazioni cellulari

HIV-RNA e conta dei linfociti T CD4+ e CD8+

I livelli di HIV-RNA sono stati misurati nel plasma conservato a -80°C, ottenuto da sangue contenuto in provette con EDTA, mediante un kit in commercio che utilizza una metodica di RT-PCR quantitativa Ultra Sensitive semi-automatizzata (Real Time Versant kPCR; Siemens Healthcare Diagnostics). Il limite di rilevazione della metodica è di 37 copie/ml. L'enumerazione dei linfociti T CD4⁺ e T CD8⁺ è stata effettuata, invece, mediante l'analisi citofluorimetrica a due colori, utilizzando un FACS-Calibur Becton Dickinson e la metodica su sangue intero con lisi e reagenti Simul TEST.

Altri esami ematochimici

Sono stati inoltre valutati l'assetto lipidico: colesterolo totale, LDL ed HDL e trigliceridi; la funzionalità tiroidea mediante dosaggio di FT3, FT4 e TSH, gli ormoni sessuali quali testosterone totale e libero ed il dosaggio della calcemia, fosforemia, della fosfatasi alcalina al momento del prelievo.

Altri parametri

Sono stati presi in considerazione inoltre come parametri di riferimento il tempo intercorso dalla diagnosi e dall'inizio della terapia ARV con PI, la storia terapeutica del paziente, il tipo di farmaci antiretrovirali ed eventuali comorbidità.

ANALISI STATISTICA

Abbiamo utilizzato il test di Student per le variabili continue e il coefficiente di correlazione di Pearson ed il modello di regressione lineare per le relazioni delle variabili. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando SPSS versione 13.0 per Windows (SPSS Inc., Apache Software Foundation, Chicago, IL., USA) significatività statistica è stata definita per valori di $p < 0,05$.

RISULTATI

I STUDIO

Per il primo studio è stato preso in considerazione un campione di 35 pazienti di sesso maschile che afferiscono al servizio di Day Hospital della I Divisione Universitaria di Malattie Infettive del Policlinico “Umberto I” di Roma con infezione da HIV accertata ed in terapia antiretrovirale da almeno 48 settimane con basso rischio cardiovascolare con un Framingham score <10. Come controllo, è stato considerato un campione di 21 soggetti HIV negativi senza rischio cardiovascolare e 20 soggetti HIV negativi con rischio cardiovascolare. I campioni di plasma sono stati raccolti nel periodo intercorrente tra Ottobre 2010 e Settembre 2012 durante i controlli cui i pazienti routinariamente si sottopongono. Tutti i prelievi sono stati effettuati previo consenso informato del soggetto. In tutti i pazienti sono stati considerati parametri immuno-virologici ed in particolar modo linfociti T CD4+ nadir ed CD4+ al momento del prelievo ed HIVRNA zenith ed al momento del prelievo. La media dei Linfociti T CD4+ al prelievo è di $570 \pm 341,28$ cell/mmc mentre quella dei linfociti T CD4 nadir è di $287,7 \pm 253,45$. Tutti i pazienti al momento del prelievo presentavano una carica virale non rilevabile (HIVRNA <37 copie/ml). I pazienti sono stati sottoposti ad esami ematochimici di valutazione della funzionalità tiroidea, degli ormoni sessuali maschili ed a dosaggio della calcemia sierica, della fosfatasi alcalina, della calcitonina e del PTH valori risultati nella norma in tutti i 35 pazienti. E' stato valutato inoltre per ogni paziente l'assetto lipidico ed sono state riscontrate concentrazioni plasmatiche di colesterolo totale pari

a $200 \pm 51,79$ mg/dl, colesterolo HDL pari a $41,8 \pm 13,67$ mg/dl, colesterolo LDL pari a $133,35 \pm 47,25$ mg/dl e di trigliceridi pari a $178,8 \pm 90,22$ mg/dl. I pazienti sono stati poi sottoposti a TC cuore con studio delle arterie coronarie per valutare la presenza di stenosi a tale livello. Il 51,3% (18/51) della popolazione studiata presentava stenosi mentre 17/35 (48.7%) non mostrava modificazioni dell'albero coronarico. (Fig.3)

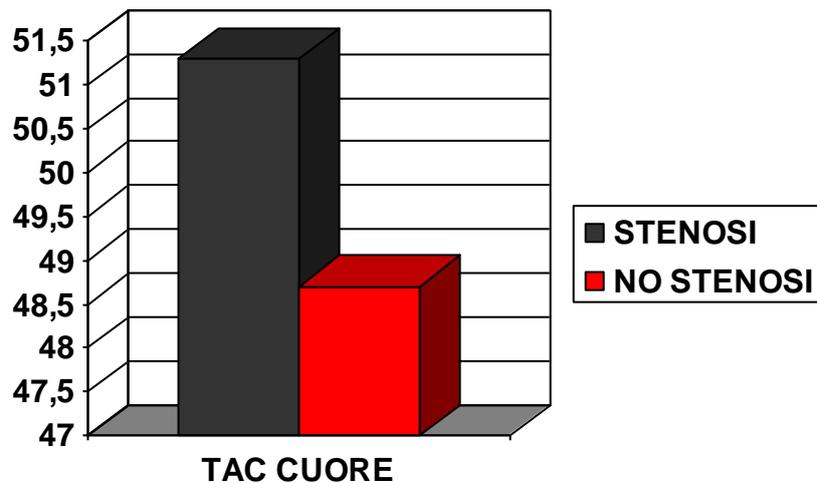


Fig.3 Pz con stenosi coronarica vs pz senza stenosi coronarica alla TC

Nei pazienti con stenosi, 5/18 (27,7%) presentavano stenosi coronariche di grado moderato (grado I) mentre 13/18 (72,3%) stenosi emodinamicamente significative (grado II). (Fig.4)

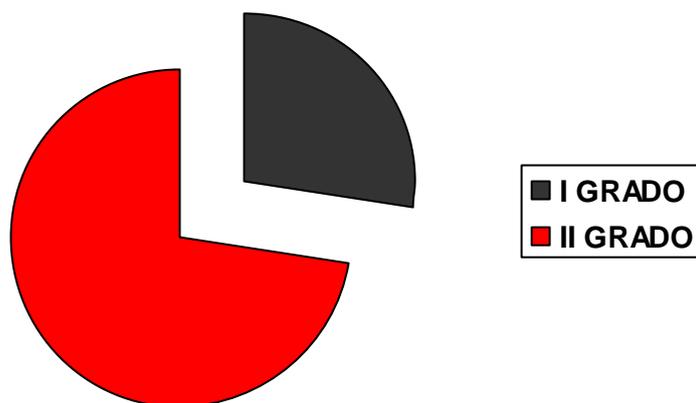


Fig.4. Pazienti con stenosi coronarica alla TC di I grado vs II grado.

Tra i pazienti con stenosi di grado II, 8/13(61,6%) avevano il coinvolgimento di un vaso e 5/13 (38,4%) 2 vasi coronarici. Tutte le placche rilevate erano di tipo eccentriche e in 10/13 (77%) erano placche molli. I 13 pazienti con stenosi significative sono stati sottoposti a coronarografia ed in 6 pazienti è stato posizionato stent medicato (Biosensors, Biomatrix DES). I 20 soggetti HIV- con Framingham score>10 hanno mostrato alterazioni elettrocardiografiche e hanno eseguito TC coronarica; di questi 8 mostravano stenosi di grado II e successivamente sottoposti a coronarografia con posizionamento di stent medicato. I 21 soggetti HIV- con Framingham score<10 non hanno mostrato alcuna alterazione a livello elettrocardiografico per cui non si è proseguito nell'esecuzione di ulteriori indagini. Andando a valutare le concentrazioni plasmatiche di OPG nella popolazione in studio sono stati riscontrati valori più elevati nella popolazione HIV+ rispetto al gruppo di controllo ma inferiori rispetto ai soggetti HIV- con Framingham score>10. ($5,79 \pm 2,82$ vs $3,6 \pm 1,7$ vs $8,6 \pm 4,3$ pmol/L) ($p=0.001$) (fig.5). E' stata poi valutata le relazione tra le concentrazioni plasmatiche di OPG ed il grado di stenosi coronarico osservato alla TAC. Dividendo i pazienti osservati in due gruppi, quelli con stenosi emodinamicamente significative maggiori del 70% (A) e quelli con stenosi inferiori del 70% (B), le concentrazioni di OPG erano più elevate nel gruppo che aveva stenosi inferiori del 70% in modo statisticamente significativo($6,1 \pm 1,5$ vs $5,3 \pm 1,7$ pmol/L) ($p=0.05$) (Fig.6).

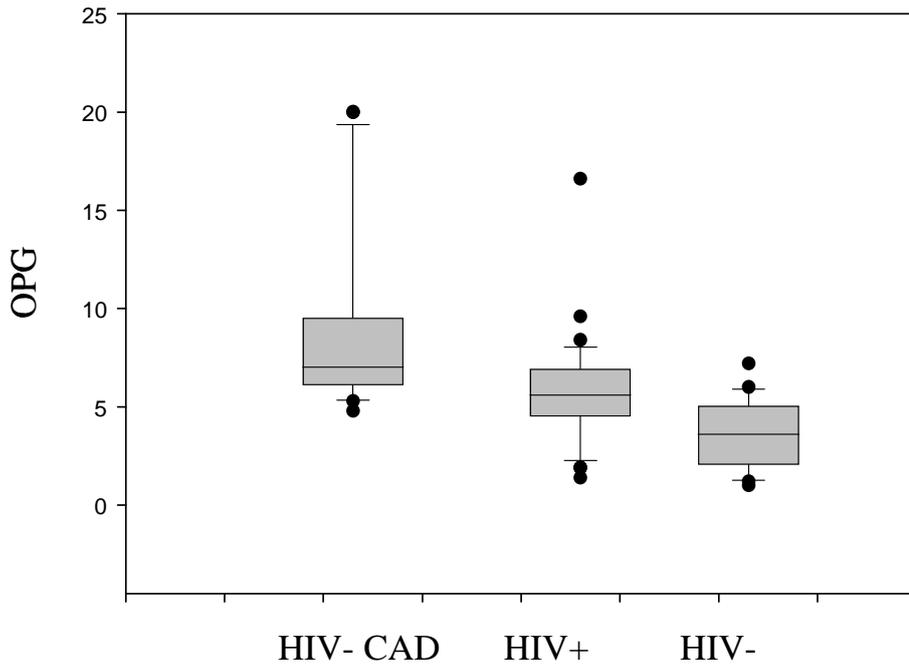


Fig.5 Concentrazioni plasmatiche di OPG tra le diverse popolazioni in studio

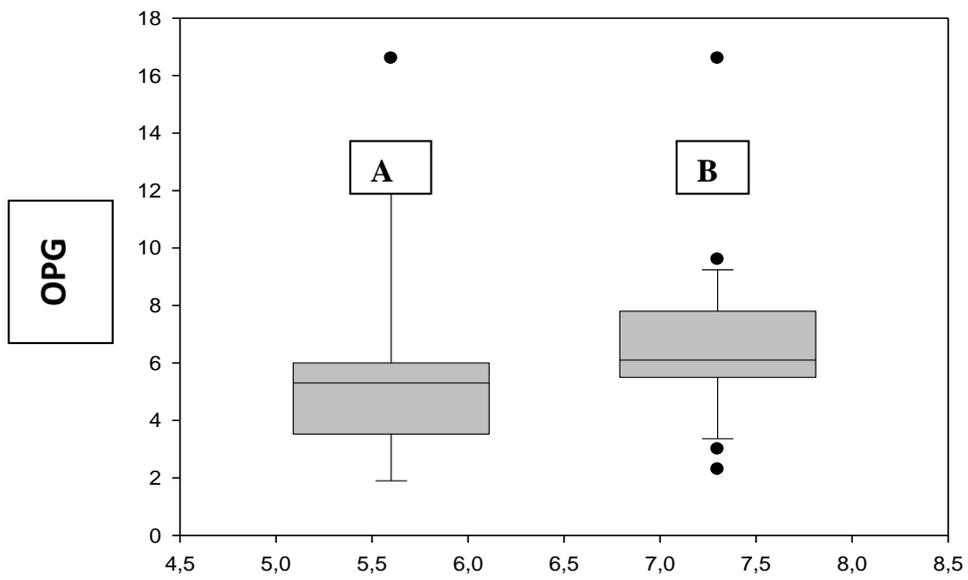


Fig.6 Concentrazioni plasmatiche di OPG gruppo A e B alla TC

Sono stati inoltre considerati come parametri da correlare le concentrazioni plasmatiche di IL6 ed il grado di stenosi alla TC cuore. Abbiamo osservato concentrazioni plasmatiche di IL6 maggiore nei pazienti HIV positivi rispetto al gruppo di controllo ma inferiori rispetto ai soggetti HIV negativi con elevato rischio cardiovascolare ($60,94 \pm 17,55$ vs $46,78 \pm 9,9$ vs $72,85 \pm 35,4$ pg/ml) ($p=0.034$) (Fig.7)

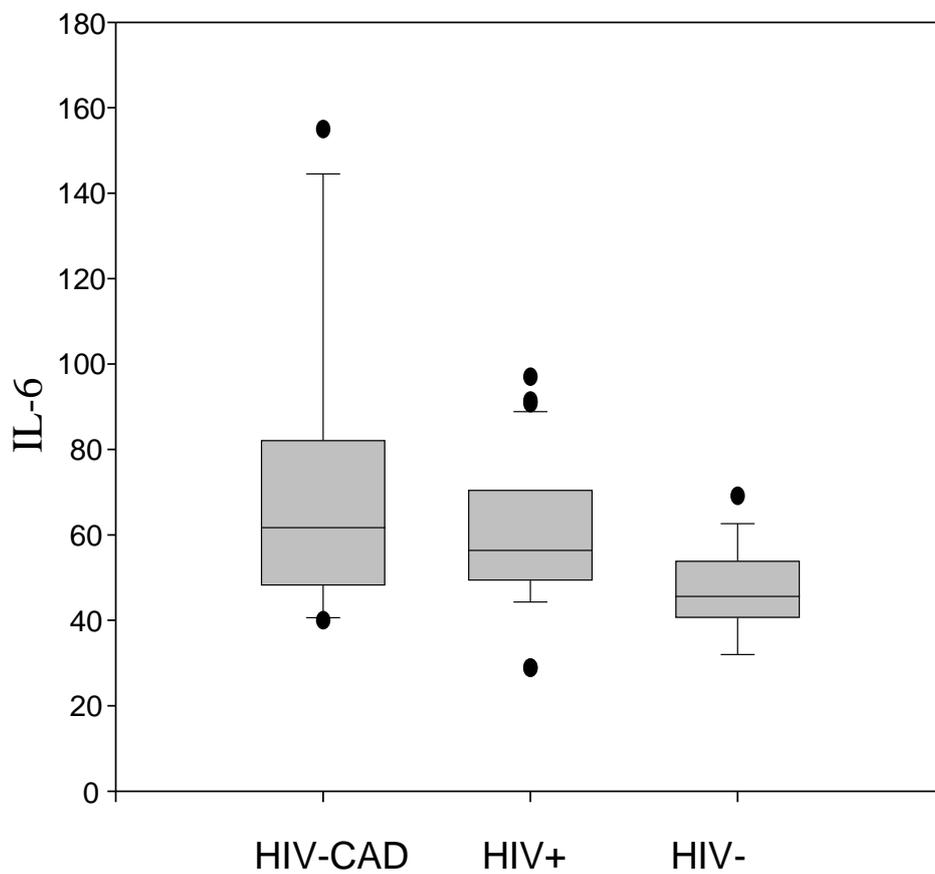


Fig.7 Concentrazioni plasmatiche di IL-6 tra le diverse popolazioni in studio

Andando a confrontare le concentrazioni plasmatiche di IL6 nei pazienti che alla TC cuore presentavano stenosi di grado II rispetto a quelli di grado I (gruppo A e gruppo B) sono state osservate maggiori concentrazioni plasmatiche nel gruppo A rispetto al B. ($63,84 \pm 17,74$ vs $51,93 \pm 13,58$ pg/ml) ($p=0.045$)(Fig.8).

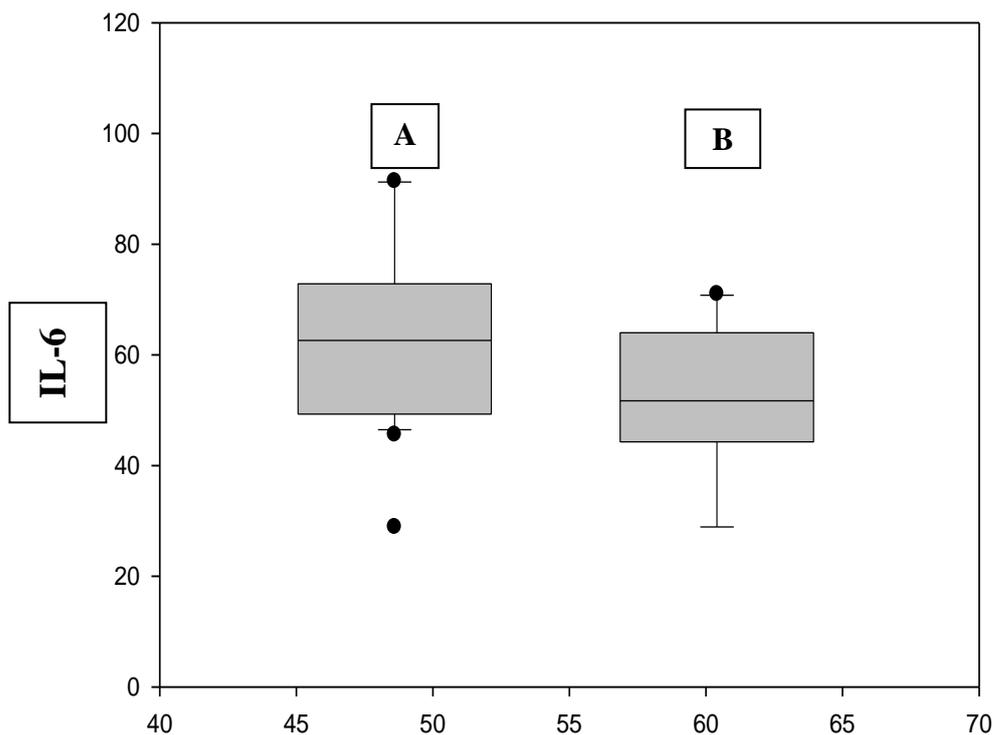


Fig.8 Concentrazioni plasmatiche di IL6 gruppo A e B alla TC

Sono state correlate le concentrazioni di colesterolo totale, LDL, HDL e trigliceridi con le concentrazioni plasmatiche di IL6 ed OPG. Sono state osservate correlazioni negative tra OPG e colesterolo totale ($p:0.032$) ed LDL ($p:0.089$) ed una correlazione positiva tra IL6 e colesterolo LDL ($p:0.039$). Infine non abbiamo trovato alcuna correlazione tra le concentrazioni plasmatiche di OPG, IL6 ed i parametri immunovirologici.

II STUDIO

Per il secondo studio invece è stato preso in considerazione un campione di 39 pazienti che afferiscono al servizio di Day Hospital della I Divisione Universitaria di Malattie Infettive del Policlinico “Umberto I” di Roma con infezione da HIV accertata ed in terapia antiretrovirale da almeno 48 settimane. E’ stato considerato un campione controllo di 24 soggetti HIV negativi comparati per età e per sesso. I campioni di sangue sono stati raccolti nel periodo intercorrente tra Gennaio 2012 e Settembre 2012 durante i controlli cui i pazienti routinariamente si sottopongono. Tutti i prelievi sono stati effettuati previo consenso informato del soggetto. Dei 39 soggetti, 34 sono di sesso maschile e 5 di sesso femminile con un’età media di 47 anni (47 ± 11). In tutti i pazienti sono stati considerati i parametri immunovirologici ed in particolar modo linfociti T CD4+ nadir ed CD4+ al momento del prelievo ed HIVRNA al momento del prelievo. La media dei linfociti T CD4+ al prelievo è di 676 ± 2648 cell/mmc mentre quella dei linfociti T CD4 nadir è di $299,25 \pm 259,2$. Tutti i pazienti al momento del prelievo presentavano una carica virale non rilevabile (HIVRNA < 37 copie/ml). E’ stato valutato inoltre per ogni paziente l’assetto lipidico dove le concentrazioni plasmatiche di colesterolo totale erano pari a $199,7 \pm 52,68$ mg/dl, colesterolo HDL pari a $48,9 \pm 11,86$ mg/dl, colesterolo LDL pari a $121,2 \pm 42,57$ mg/dl e di trigliceridi pari a $148,8 \pm 74,1$ mg/dl. I pazienti sono stati sottoposti ad ecocolordoppler dei vasi epiaortici con studio dell’ispessimento mio-intimale della carotide esterna bilateralmente ad 1 cm dal bulbo. I valori di ispessimento a sinistra erano pari a $0,817 \pm 0,188$ mm mentre a destra $0,838 \pm 0,197$ mm. Dei soggetti HIV positivi, 16/39 (41%)

presentavano un'ispessimento miointimale $\geq 0,9$ mm mentre 23/39 (59%) un'ispessimento $\leq 0,9$ mm. (Fig.10)

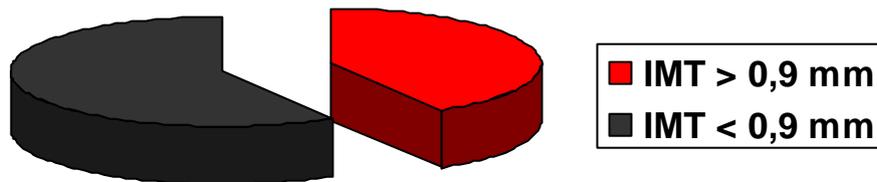


Fig.10 Ispessimento miointimale carotideo nei pazienti HIV+

Rispetto al gruppo di controllo, l'ispessimento mio intimale nei soggetti HIV positivi risultava più elevato sia a destra che a sinistra con significatività statistica. (IMT SN $0,817 \pm 0,188$ mm vs $0,493 \pm 0,116$ mm $p < 0,001$; IMT DS $0,838 \pm 0,197$ mm vs $0,521 \pm 0,104$ mm $p < 0,001$)(Fig.11 e 12).

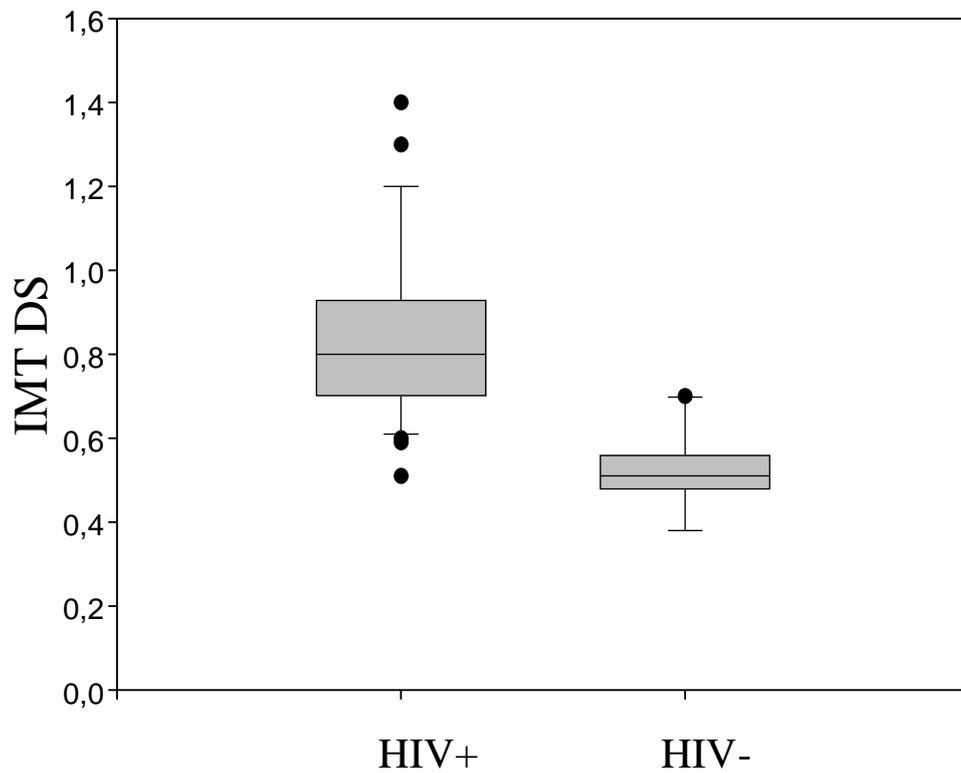


Fig11. IMT destro nei pazienti HIV+ vs HIV-

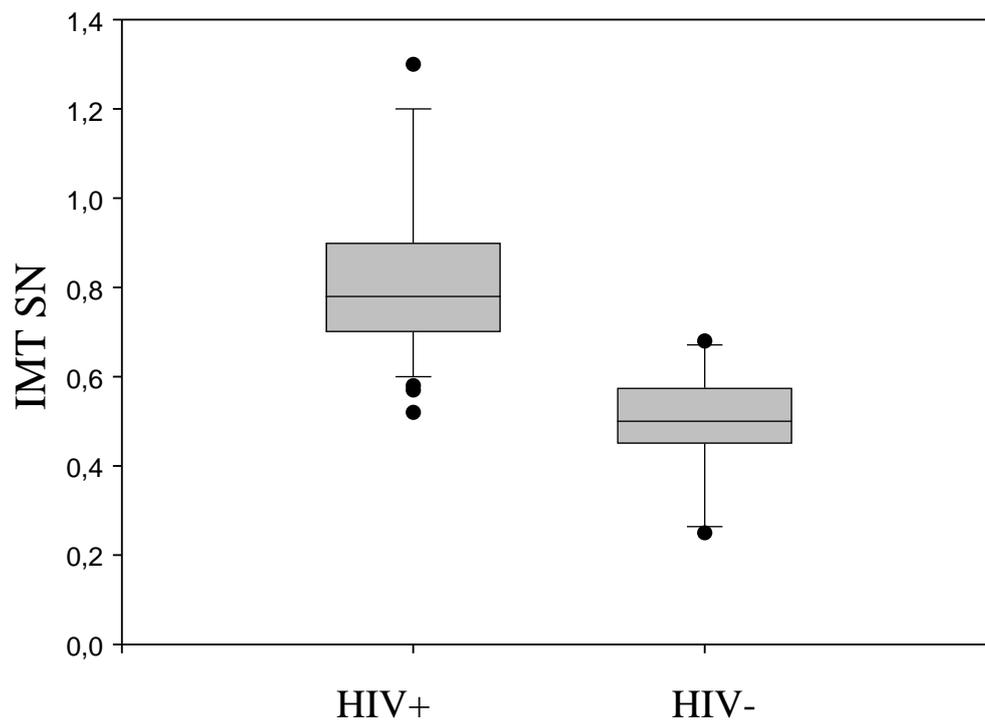


Fig.12 IMT sinistro nei pazienti HIV+ vs HIV-

Andando a valutare le concentrazioni plasmatiche di Osteoprotegerina nella popolazione in studio sono stati rilevati valori più elevati nella popolazione HIV positiva rispetto al gruppo di controllo. ($5,01 \pm 2,47$ vs $2,6 \pm 1,7$ pmol/L) ($p=0.002$). (Fig.13)

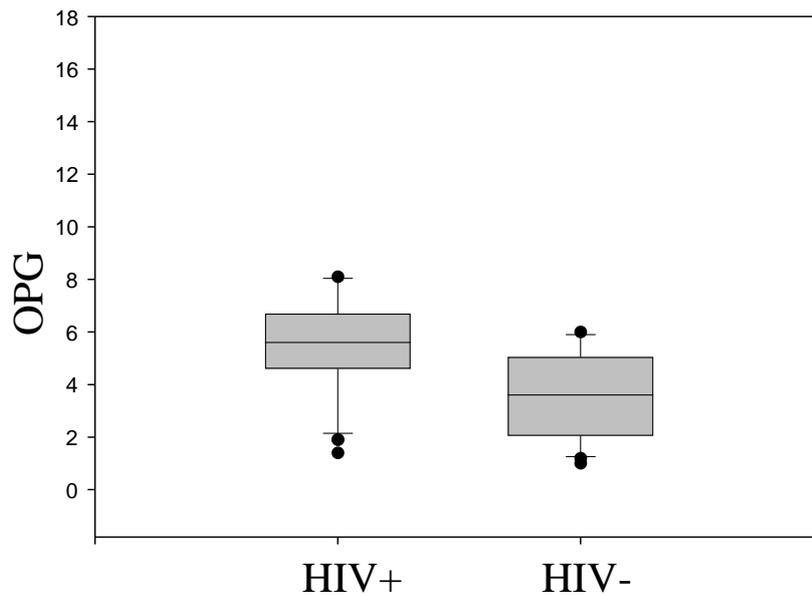


Fig. 13 Concentrazioni plasmatiche di OPG nei pz HIV+ vs HIV-

Le concentrazioni plasmatiche di IL6 erano maggiore nei pazienti HIV positivi rispetto ai soggetti HIV negativi ($58,96 \pm 16,55$ vs $44,48 \pm 9,2$ pg/ml) ($p=0.004$). (Fig.14)

Si è trovata una correlazione inversa tra i livelli di linfociti T CD4+ nadir con le concentrazioni plasmatiche di IL-6 ($p=0,024$) (Fig.15) ed OPG ($p=ns$).

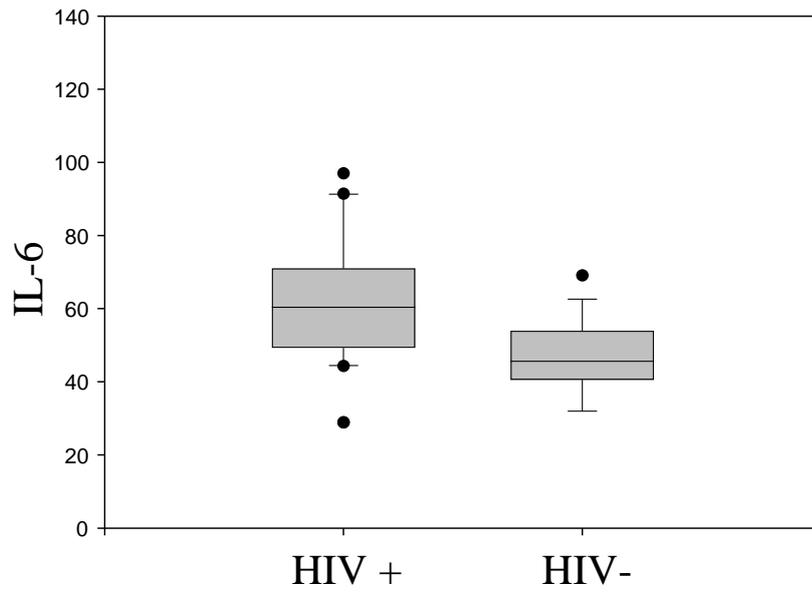


Fig. 14 Concentrazioni plasmatiche di IL-6 nei pz HIV+ vs HIV-

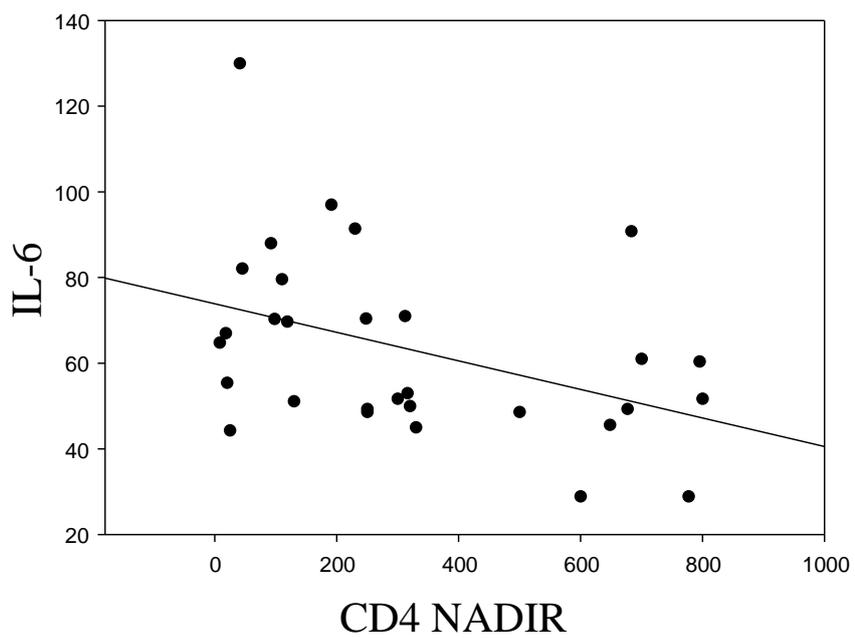


Fig.15 Correlazione inversa tra IL-6 e CD4 nadir

Per l'analisi dell'attivazione e della senescenza dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ sono stati presi in considerazione i valori in percentuale (%) dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ doppi positivi (HLA-DR⁺ CD38⁺), linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ doppi positivi con fenotipo immunosenescente (HLA-DR⁺ CD38⁺ CD28⁻ CD57⁺) e linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ doppi positivi (CD28⁻ CD57⁺).

Nei soggetti HIV positivi la mediana dei valori % dei linfociti T CD4⁺ positivi HLA-DR⁺ CD38⁺ risultava maggiore rispetto alla popolazione di controllo in modo statisticamente significativo (1,150 (0,684-2,768) vs 0,349 (0,179-0,584)) (p<0,001). (Fig.16)

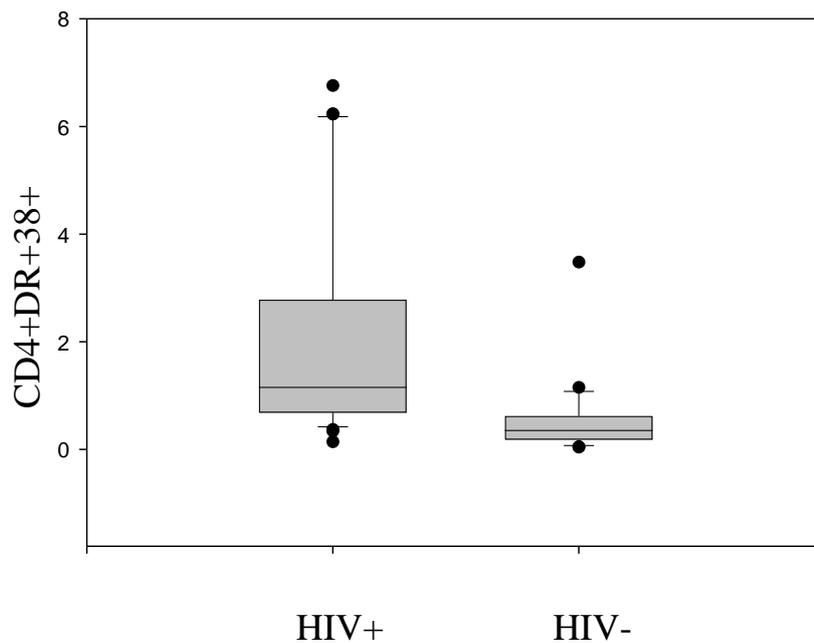


Fig.16 Mediana dei valori % dei linfociti T CD4⁺ positivi HLA-DR⁺ CD38⁺ nei pz HIV+ vs HIV-

La mediana dei valori % dei linfociti T CD4⁺ positivi HLA-DR⁺ CD38⁺ CD28-CD57⁺ risultava maggiore rispetto alla popolazione di controllo in modo statisticamente significativo (1,680 (0,953-3,493) vs 0,287 (0,000-1,705)) (p=0,003). (Fig.17)

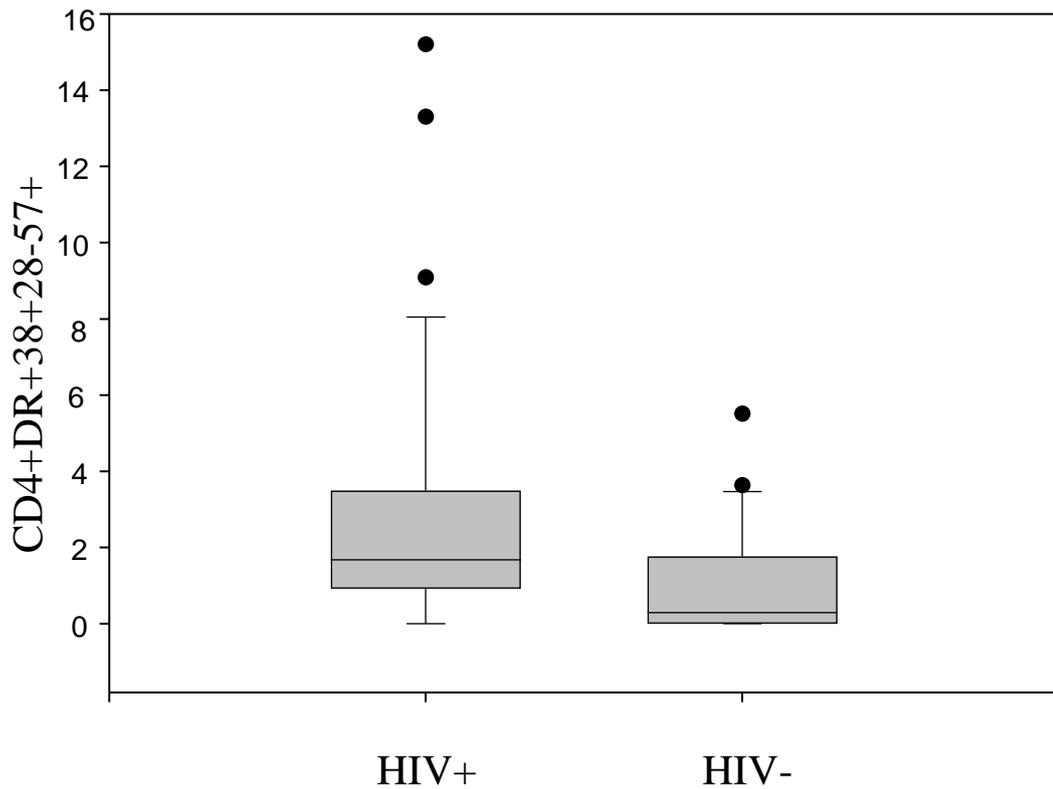


Fig.17 Mediana dei valori % dei linfociti T CD4⁺ positivi HLA-DR⁺ CD38⁺28-57⁺ nei pz HIV+ vs HIV-

La mediana dei valori % dei linfociti T CD4⁺ positivi CD28-CD57⁺ risultava maggiore rispetto alla popolazione di controllo in modo statisticamente significativo (3.160 (1,155-6,662) vs 0,875 (0,177-2,225)) (p=0,004). (Fig.18)

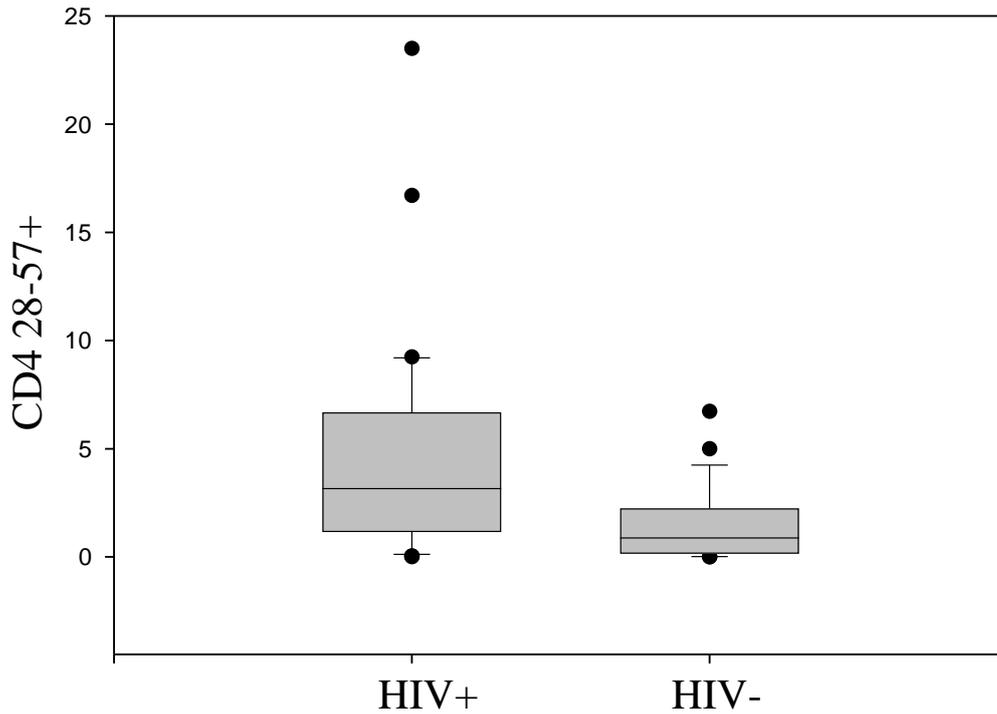


Fig.18 Mediana dei valori % dei linfociti T CD4⁺ positivi CD28-57⁺ nei pz HIV+ vs HIV-

Per quanto riguarda invece i linfociti T CD8+, la mediana dei valori % doppi positivi HLA-DR+ CD38+ risultava maggiore rispetto alla popolazione di controllo in modo statisticamente significativo (1,100 (0,755-1,678) vs 0,698 (0,440-1,275)) (p=0,033) (Fig.19).

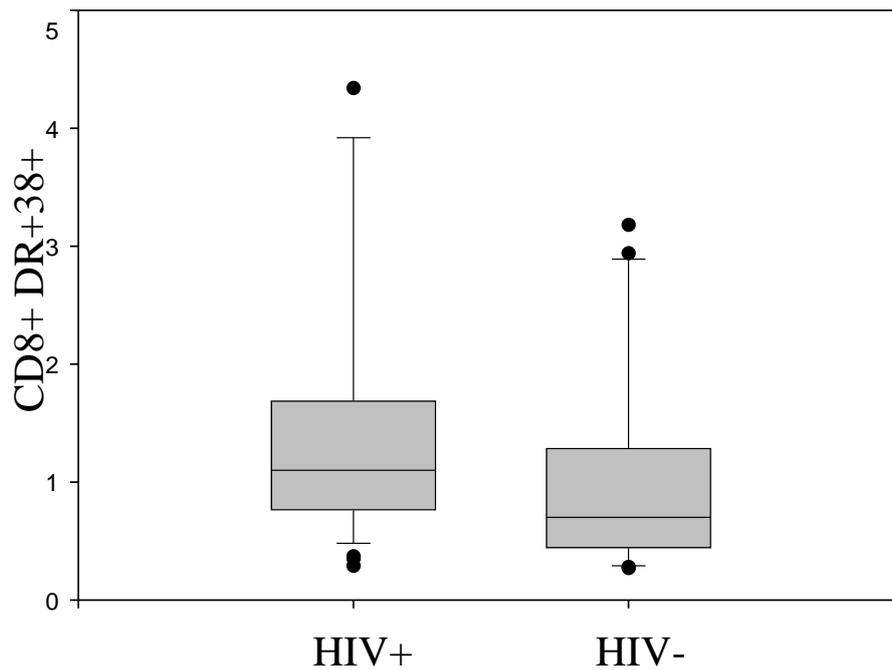


Fig.19 Mediana dei valori % dei linfociti T CD8+ positivi HLA-DR+ CD38+ nei pz HIV+ vs HIV-

La mediana dei valori % dei linfociti T CD8+ positivi HLA-DR+ CD38+ CD28-CD57+ risultava maggiore rispetto alla popolazione di controllo in modo statisticamente significativo (5,930 (3,387-9,090) vs 2,420 (0,553-4,060)) (p=0,002) (Fig 20)

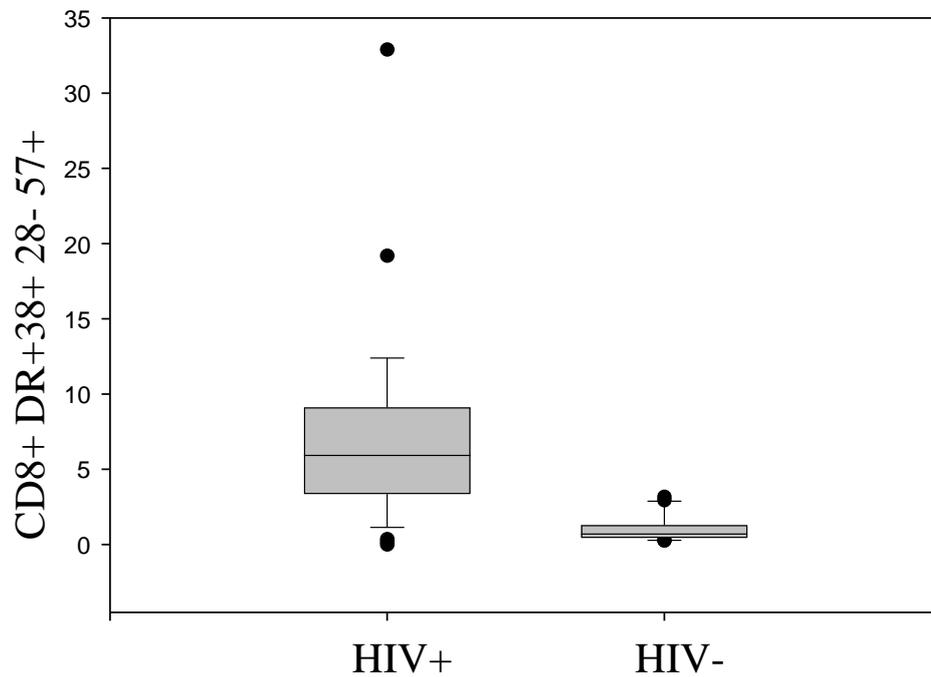


Fig.20 Mediana dei valori % dei linfociti T CD8⁺ positivi HLA-DR⁺ CD38+28-57+ nei pz HIV⁺ vs HIV⁻

La mediana dei valori % dei linfociti T CD8⁺ positivi CD28-CD57⁺ risultava maggiore rispetto alla popolazione di controllo in modo statisticamente significativo (9.100 (1,998-17,175) vs 0,626 (0,307-0,873)) (p<0,001) (Fig.21).

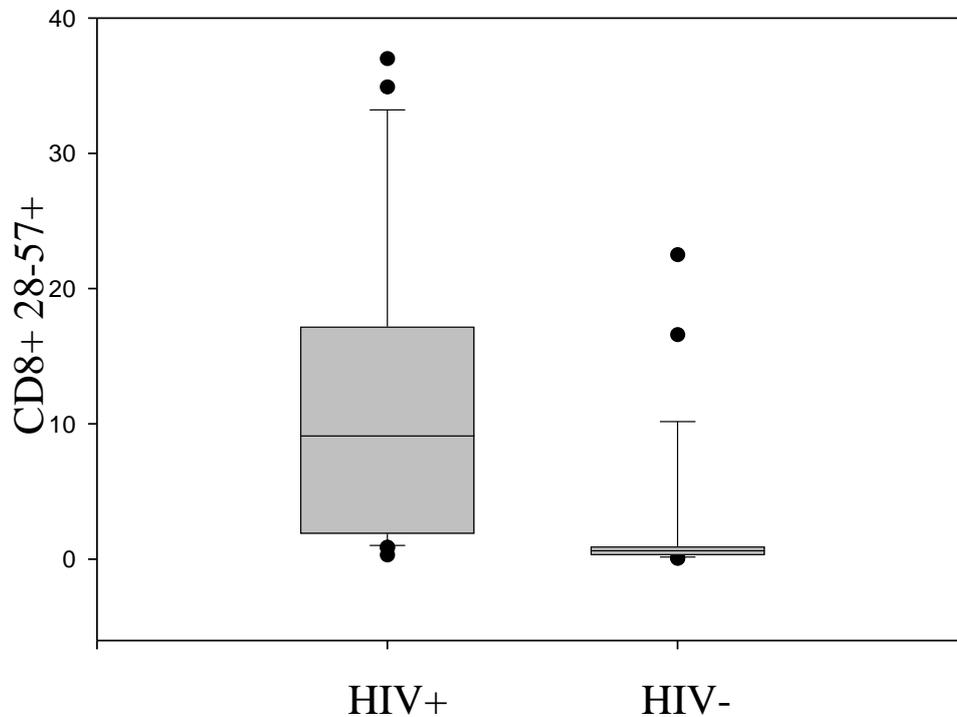


Fig.21 Mediana dei valori % dei linfociti T CD8⁺ positivi CD28-57⁺ nei pz HIV⁺ vs HIV⁻

Si è osservata una correlazione positiva tra i linfociti T CD8⁺ 28-57⁺ con i valori di linfociti T CD4 nadir ($p=0,069$) mentre non è stata osservata alcuna relazione con i linfociti T CD4⁺ DR⁺ CD38⁺ e quelli CD28-CD57⁺ e con i linfociti T CD8⁺ DR⁺ CD38⁺. Rispetto agli anni di terapia dei pazienti HIV positivi, si è trovata una correlazione inversa tra i linfociti T CD4⁺ CD28-CD57⁺ ($p=0,036$)(Fig.22) e CD8⁺ CD28-CD57⁺ ($p=0,092$) (Fig.23).

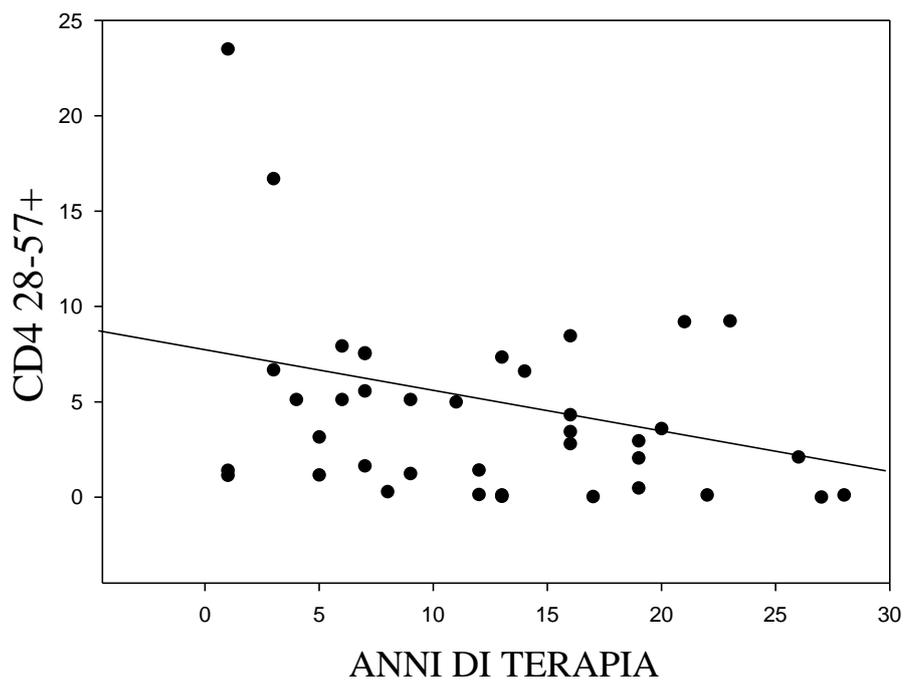


Fig.22 Correlazione inversa tra anni terapia e CD4+ CD28-57+

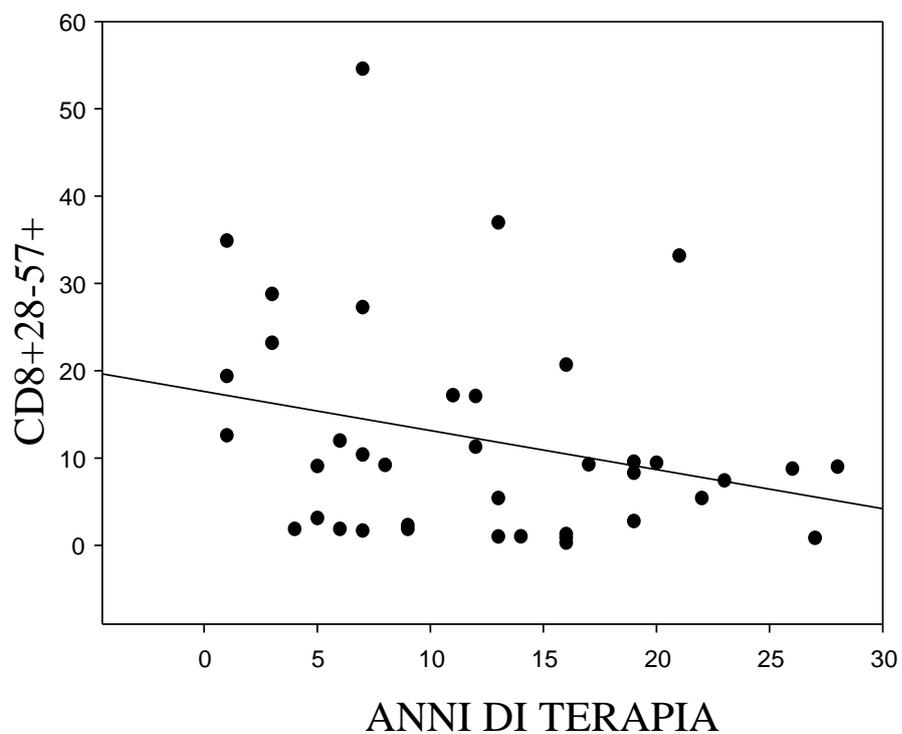


Fig.23 Correlazione inversa tra anni terapia e CD8+ CD28-57+

Non sono state trovate correlazioni rispetto ai linfociti T CD4+ e CD8+ immunoattivati rispetto agli anni di terapia. Si è correlato i livelli di immunoattivazione ed immunosenescenza dei linfociti T+ CD4+ e CD8+ con i fattori solubili quali IL-6 ed OPG. I linfociti T CD4+ CD28-CD57+ hanno una correlazione positiva con le concentrazioni plasmatiche di IL-6 ($p=0,04$)(Fig.24) ed OPG ($p=ns$).

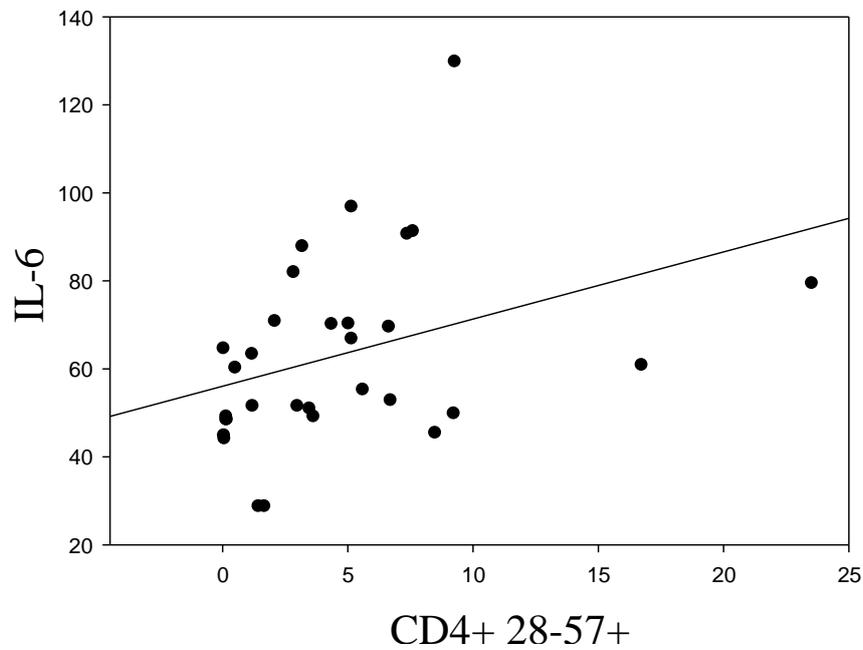


Fig.24 Correlazione diretta tra CD4+28-57+ ed IL-6

Non sono state trovate correlazioni con i linfociti T CD4+ e CD8+ immunoattivati ed i linfociti T CD8+ immunosenescenti con IL6 ed OPG. Non è stata trovata correlazione tra i valori di immunoattivazione e di immunosenescenza sia dei linfociti T CD4 che dei CD8 con i valori di spessore miointimale carotideo. Pertanto, si è stratificato i pazienti HIV positivi in basi ai valori di IMT al di sopra e al di sotto di 0,9 mm (valore soglia di patologia). I pazienti con IMT >0,9 mm presentavano valori di linfociti T CD4+ DR+38+ più elevati rispetto a quelli con IMT <0,9mm con significatività statistica. (1,570 (0,811-2,9) vs 0,720 (0,560-1,780)) ($p=0,029$) (Fig.25)

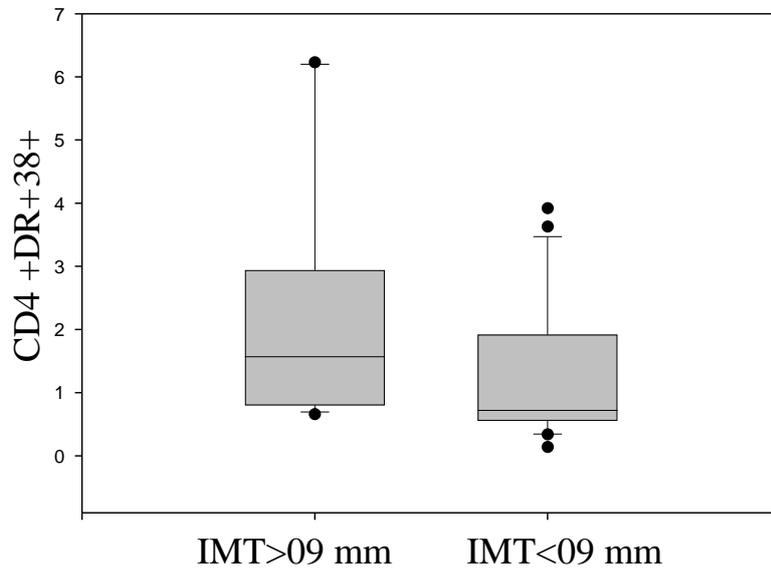


Fig.25 CD4+DR+38+ più elevati nei pz con IMT > 0,9 mm vs IMT < 0,9 mm

Valori più elevati di linfociti T CD4+ DR+ CD38+ CD28-CD57+ e CD28-CD57+ si sono riscontrati nei pazienti con IMT >0,9 mm rispetto a quelli con IMT<0,9 anche se in modo non statisticamente significativo (2,647 vs 1,974 e 3,3 vs 2,06 $p=ns$). Per quanto riguarda invece i linfociti T CD8+, i valori di quelli DR+38+ erano più elevati nei pazienti con IMT >0,9mm. (1,380 (1,058-1,910) vs 1,050 (0,694-1,510)) ($p=0,069$). (Fig 26)

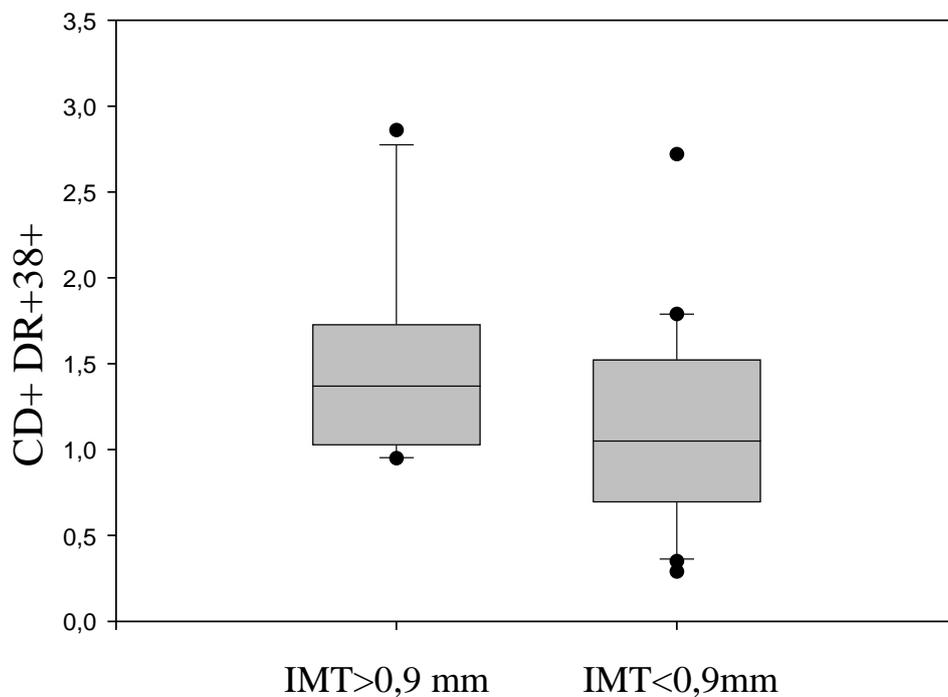


Fig.26 CD8+DR+38+ più elevati nei pz con IMT>0,9 mm vs IMT<0,9 mm

Valori più elevati di linfociti T CD8+ DR+ CD38+ CD28-CD57+ e CD28-CD57+ si sono riscontrati nei pazienti con IMT >0,9 mm rispetto a quelli con IMT<0,9 anche se in modo non statisticamente significativo. Si sono osservati valori di IMT più elevati nei pazienti che avevano un nadir dei linfociti T CD4+ < 200mmc rispetto a quelli che avevano un nadir >200 mmc (0,9 vs 0,76mm) ($p=0,002$)(Fig.27)

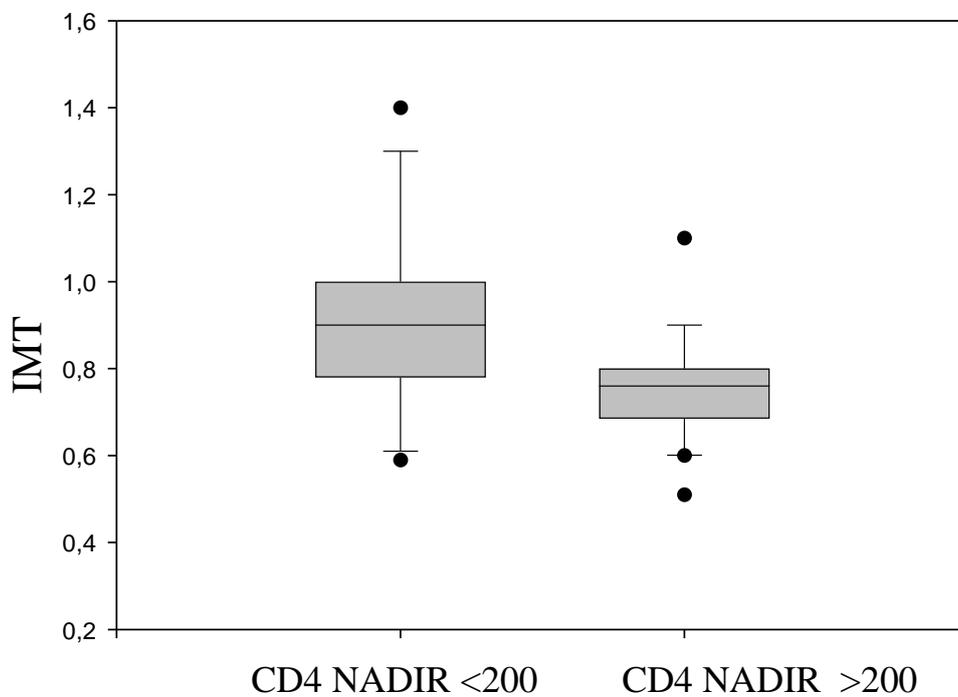


Fig.27 IMT nei pz con CD4 nadir <200 mmc vs pz con CD4 nadir >200 mmc

Rispetto ad IL-6 ed OPG, si sono osservate correlazioni dirette con l'IMT anche se in modo non statisticamente significativo. Si sono osservate correlazioni positive tra i valori di body mass index (BMI) ed i livelli di IMT ($p=0,076$). Non ci sono invece correlazioni tra i valori di colesterolo totale, colesterolo HDL ed LDL e trigliceridi con l'IMT.

CONCLUSIONI

E' ormai accertata la maggiore prevalenza di rischio cardiovascolare nei pazienti HIV positivi sia in età adulta che in età pediatrica (Hakeem A.; 2010). Diversi fattori di rischio giocano un ruolo importante nella patogenesi e nella progressione dell'aterosclerosi: tossicità sia ART (disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo indotto da analoghi della timidina o anche l'accumulo anomalo di laminina A associata con inibitore della proteasi HIV) e il virus stesso inducono disturbi metabolici, attivazione immunitaria e infiammazione cronica (Coll B 2007). Oltre ai già noti fattori di rischio, quali dislipidemia, ipertensione arteriosa, fumo, diabete ed obesità, esistono fattori di rischio non convenzionali che contribuiscono al rischio cumulativo di sviluppare danno cardiovascolare (Lorenz M.W., 2008). Diversi chemochine/citochine e altri fattori solubili sono coinvolti in questo processo, inclusi IL-6, citochina pro-infiammatoria ed il sistema OPG / RANK / RANKL, membro della superfamiglia TNF. (Worm S.W. 2010; Melander O., 2009; Biasillo G., 2010; Guzman-Fulgencio M., 2011; Ross A.C., 2009; Cheng X., 2003, Stejskal D, 2001; Wright HL., 2009).

Sulla base di queste osservazioni, nel primo studio sono stati inclusi 35 pazienti di sesso maschile con infezione da HIV, in trattamento antiretrovirale da almeno 48 settimane e con un basso rischio cardiovascolare valutato con il Framingham score confrontati con due gruppi di controllo, uno di 21 soggetti HIV negativi con Framingham score <10 ed uno di 20 soggetti HIV negativi con Framingham score >10. In tutti i pazienti sono stati valutati sia i fattori di rischio convenzionali per malattie cardiovascolari come l'assetto lipidico (colesterolo totale, HDL, LDL e

trigliceridi), glicemia, ipertensione arteriosa ed abitudine al tabagismo sia fattori non convenzionali come IL6 ed OPG. I pazienti sono stati sottoposti a studio TC cuore per determinare le stenosi a livello dell'albero coronarico come valutazione del danno organico.

Dallo studio TC cuore, è emerso come sia aumentata la prevalenza di malattia cardiovascolare nei pazienti HIV positivi ed in particolar modo il 51,3% della popolazione HIV positiva studiata mediante tale metodica presentava stenosi coronariche di cui il 72,3% emodinamicamente significative nonostante avessero un rischio cardiovascolare basso.

In accordo alle linee guida della American Heart Association (Patel MR.,2009; King SB 3rd; 2008), tali pazienti sono stati sottoposti a coronarografia e nel 46,1% dei casi è stato necessario posizionare stent medicato nel vaso stenotico.

La TAC cuore è sicuramente una metodica emergente, facilmente realizzabile, non invasiva che può contribuire sostanzialmente alla diagnosi e al management della patologia cardiovascolare. Tale metodica è in grado di distinguere placche calcifiche, non calcifiche e parzialmente calcifiche, di quantificare le stenosi, il loro grado e la loro estensione. Attualmente non è raccomandata nei soggetti asintomatici come metodo di screening anche se è oggetto di dibattito soprattutto per la sua capacità di identificare precocemente placche non calcifiche e potenzialmente a rischio di embolizzazione. (Hamilton-craig C.R 2012; d'Ettorre G., 2012; Lo J., 2010;. Cerqueira MD., 2002; Austen WG., 1975). Successivamente nello studio, sono state riscontrate elevate concentrazioni plasmatiche di IL6 ed OPG nella popolazione HIV positiva rispetto ad un gruppo di controllo HIV

negativo con Framingham score <10 ma inferiori rispetto a quelli con Framingham score >10.

IL-6 è una citochina multifunzionale, secreta da molti tipi cellulari, come macrofagi, linfociti T e cellule endoteliali. Diversi studi hanno costantemente dimostrato che i livelli basali di IL-6 sono potente predittore di eventi cardiovascolari. Nello studio si è osservato una correlazione tra l'aumento dei livelli plasmatici di IL-6 e la gravità delle stenosi coronariche suggerendo il ruolo pro-aterogenico di questa citochina, nonostante la soppressione dell' HIV-RNA sotto HAART.

Come noto, esiste un legame tra replicazione virale residua dell'HIV, l' infiammazione, la disfunzione endoteliale e l' aterosclerosi: la replicazione virale residua, l'espressione virale persistente e la perdita di cellule immunomodulanti possono indurre un' attivazione immunitaria e dell'infiammazione la cui persistenza può provocare disfunzione endoteliale con danno vascolare con risultato finale nell'aterosclerosi.

Osteoprotegerina, invece, parte del sistema RANK / RANKL membro della superfamiglia del TNF, in primis implicata nel rimodellamento osseo, è coinvolto anche nel sistema immunitario e nel sistema vascolare. RANKL, espresso da osteoblasti e dei loro precursori, attiva il suo recettore RANK, espresso da cellule osteoclasti e dei loro precursori, promuove la formazione e l'attivazione degli osteoclasti e prolunga la sopravvivenza degli osteoclasti. Gli effetti di RANKL sono bloccati da Osteoprotegerina glicoproteina secretoria che agisce come un recettore decoy per RANKL. Cambiamenti nel rapporto RANKL / OPG sono critici nella patogenesi della malattia ossea evolvendo verso l'osteopetrosi o verso osteopenia/osteoporosi. (Boyce Brendan F., 2008; Hofbauer L. C.,2004).

Diversi studi hanno mostrato la relazione tra osteopenia/osteoporosi e la malattia vascolare dove OPG potrebbe essere considerata come un ponte tra il sistema osseo con quello vascolare. (Kiechl S., 2006)

Il ruolo di OPG nella malattia cardiovascolare è ancora dibattuta: alcuni autori hanno dimostrato il ruolo di pro-aterogenico mentre altri il suo ruolo anti-aterogenico. A sostegno dell'effetto anti-aterogenico, ci sono studi che hanno mostrato un' accelerata progressione della lesione aterosclerotica nei topi OPG gene knockout (Bennett BJ.,2006). Agendo come un recettore decoy di RANKL, OPG blocca l'effetto di RANKL attivando le proprietà chemio tattiche ed angiogeniche dell'endotelio, potenziando l'infiltrazione di monociti e linfociti T e migliorando la differenziazione osteogenica delle cellule muscolari lisce vascolari e diminuendo la loro apoptosi con una maggior stabilità della placca. D'altra parte, OPG potrebbe contribuire alla disfunzione endoteliale bloccando RANKL che è in grado di attivare percorsi protettivi nelle cellule endoteliali come la ossido nitrico sintasi. Inoltre, aumenterebbe l'adesione e la migrazione di cellule infiammatorie attraverso l'endotelio, l'attività delle metalloproteasi sia indipendentemente che in modo dipendente dal legame con RANKL, l'inibizione dell'apoptosi delle cellule infiammatorie attraverso il legame con TRAIL e l'apoptosi delle cellule muscolari lisce endoteliali con un aumento della instabilità della placca (Collin-Osdoby P., 2004; Van Campenhout A.,2009).

Nel nostro studio, è emerso come i livelli plasmatici di OPG erano più elevati nei soggetti HIV positivi rispetto HIV negativi con framingham score <10 ma inferiore ai soggetti HIV negativi con framingham score>10. Inoltre nei pazienti HIV positivi, i valori di OPG erano più elevati nei pazienti con stenosi di grado I rispetto a quelli di grado II. Questo

supporterebbe l'ipotesi dell'associazione tra aterosclerosi e livelli plasmatici di OPG. A supporto di ciò, si sono osservate aumentate concentrazioni plasmatiche di OPG anche nei pazienti HIV positivi con Framingham score < 10 e senza aterosclerosi clinica. Invece nei pazienti HIV negativi con stenosi di grado severo, abbiamo trovato i livelli plasmatici di OPG più elevati rispetto agli uomini HIV positivi. Si può spiegare questo risultato come la diversa composizione e fase delle placche nei soggetti HIV negativi in cui la concentrazione di calcio era superiore rispetto ai pazienti HIV positivi dove la maggior parte delle placche (77%) erano molli. Sebbene in corso di osteoporosi siano stati descritti elevati livelli di OPG ma come meccanismo di contro-regolazione alla produzione di RANKL per proteggere la perdita ossea, nel sistema vascolare l'aumento dei livelli plasmatici di OPG può essere indice di danno endoteliale. (Lieb W., 2010; Montecucco F., 2007; Quercioli A., 2010; Vik A., 2011; Schoppet M., 2003; Hwang JJ., 2012).

Nello scenario dell'infezione da HIV e della patologia cardiovascolare intesa come malattia infiammatoria, un ruolo importante è stato attribuito all'immunoattivazione e all'immunosenescenza dei linfociti T CD4+ e CD8+ (Deeks SG., 2009).

Pertanto per il secondo studio è stato preso in considerazione un campione di 39 pazienti che afferiscono al servizio di Day Hospital della I Divisione Universitaria di Malattie Infettive del Policlinico "Umberto I" di Roma con infezione da HIV accertata ed in terapia antiretrovirale da almeno 48 settimane. È stato considerato un campione controllo di 24 soggetti HIV negativi comparati per età e per sesso. I pazienti sono stati sottoposti ad ecocolordoppler dei vasi epiaortici con studio dello spessore miointimale

carotideo ad 1 cm dal bulbo bilateralmente e per ognuno di essi valutati i livelli di immunoattivazione, immunosenescenza e le concentrazioni plasmatiche di OPG ed IL-6.

Anche da questo secondo studio è emerso come sia aumentata la prevalenza di malattia cardiovascolare nei pazienti con infezione da HIV valutata mediante misurazione dell'ispessimento mio-intimale carotideo. I pazienti HIV positivi presentavano un ispessimento miointimale che era significativamente più elevato rispetto ai soggetti HIV negativi comparati per età e sesso. Inoltre, l'IMT risultava maggiore nei pazienti che presentavano valori di linfociti T CD4+ nadir al di sotto delle 200 cellule/mmc. Numerosi studi dimostrano come la misurazione dell'ispessimento miointimale carotideo sia fortemente associata con l'infarto del miocardio e con eventi cardiovascolari (Hsue P.,2004; Lichtner M., 2004).

Lo studio dell'IMT a livello carotideo è stato ormai validato come metodica non invasiva per il monitoraggio della formazione e progressione dell'aterosclerosi e la valutazione del rischio di cardiovascolare nei pazienti con infezione da HIV.

Altresì, si sono riscontrate concentrazioni plasmatiche di OPG ed IL-6 significativamente più elevate nei pazienti HIV positivi rispetto ai soggetti HIV negativi.

Sono stati analizzati i livelli di immunoattivazione e di immunosenescenza dei linfociti T CD4+ e CD8+ nei due gruppi in studio e successivamente correlati con il danno d'organo espresso dall'aumento dell'intima carotidea e con la produzione plasmatica di IL-6 ed in particolar modo di OPG.

In accordo ai dati di letteratura, che mostrano un incremento dei livelli di linfociti T attivati nel corso dell'infezione da HIV, è stata valutata la percentuale di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ che co-esprimono entrambi i marcatori di attivazione cellulare, CD38 e HLA-DR, sia nei pazienti con infezione da HIV che nei soggetti sani. I dati emersi dal nostro studio mostrano un incremento significativo delle percentuali dei linfociti T CD4⁺ HLA-DR⁺ CD38⁺ e CD8⁺ HLA-DR⁺ CD38⁺ nei pazienti con infezione da HIV in terapia rispetto ai controlli sani.

E' stata valutata la percentuale di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ che co-esprimono i marcatori di senescenza cellulare, CD28 e CD57, sia nei pazienti con infezione da HIV che nei soggetti sani. I dati emersi dal nostro studio mostrano un incremento significativo delle percentuali dei linfociti T CD4⁺ CD28⁻ CD57⁺ e CD8⁺ CD28⁻ CD57⁺ nei pazienti con infezione da HIV in terapia rispetto ai controlli sani. Infine è stata valutata la percentuale di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ che esprimevano CD28⁻ CD57⁺, anche questa popolazione cellulare era significativamente più elevata nei pazienti con infezione da HIV in terapia rispetto ai controlli sani.

Tutti i pazienti considerati nello studio sono virologicamente soppressi (HIVRNA < 37 copie/ml) e sono in terapia antiretrovirale da almeno 48 settimane. Andando a confrontare i livelli di immunattivazione e di immunosenescenza con la durata di terapia, è emerso come ci sia una correlazione inversa con l'immunosenescenza e non con l'immunoattivazione.

E' noto come la terapia HAART sembra ridurre la percentuale dei linfociti T immunoattivati ed anche dei linfociti T CD28⁻ e sembra migliorarne la funzionalità. In alcuni soggetti, nonostante la terapia risulti efficace nel

sopprimere la replicazione virale, persistono delle alterazioni del sistema immunitario, in senso di senescenza, nel compartimento CD4 e CD8, con incremento delle cellule di memoria effettrici esprimenti il CD57 a discapito della popolazione naive. Tale alterazione sembra essere associata alla morbidità non-AIDS correlata in corso di terapia HAART. E' risultato come i linfociti T CD4+ CD28-CD57+ avessero una correlazione positiva con le concentrazioni plasmatiche di IL-6 ed OPG mentre non sono state trovate correlazioni con i linfociti T CD4+ e CD8+ immunoattivati ed i linfociti T CD8+ immunosenescenti.

In corso di infezione da HIV le modificazioni del sistema immunitario in senso "senescente" sembrano apparire precocemente. Questo fenomeno di invecchiamento anticipato delle cellule del sistema immunitario sembra essere in stretta correlazione con il loro stato di attivazione. Infatti l'immunoattivazione delle cellule T determina un aumentato numero di replicazioni cellulari con precoce accorciamento dei telomeri, perdita sulla superficie dei linfociti T dell'espressione del CD28 e presenza dell'antigene di superficie CD57; questo si associa alla secrezione di citochine pro-infiammatorie come IL-1, IL-6, TNF α e probabilmente di OPG. L'aumento di tali citochine, dimostrato anche nel nostro studio, correlava in modo positivo con l'aumento dell'ispessimento miointimale. Inoltre, i pazienti che presentavano un ispessimento miointimale patologico con valori al di sopra dei 0,9 mm presentavano livelli di immunoattivazione e di immunosenescenza sia dei linfociti T CD4+ che dei CD8+ più elevati rispetto a quelli con un IMT inferiore a 0,9 mm. Questo a dimostrare come sia l'immunoattivazione che l'immunosenescenza con la conseguente

secrezione di citochine pro infiammatorie abbiano un impatto sull' outcome clinico dei pazienti HIV positivi.

Sebbene la terapia antiretrovirale abbia modificato la durata e la qualità di vita dei pazienti con infezione da HIV riducendo le patologie opportunistiche AIDS-relate, dall'altra parte negli ultimi anni si è assistito ad un aumento delle patologie non AIDS-relate. Diversi studi hanno documentato l'aumentata prevalenza di osteopenia ed osteoporosi e un maggior rischio per i pazienti HIV positivi di vasculopatia, infarto del miocardio e di aterosclerosi. Numerosi sono i fattori implicati nella patogenesi del rischio cardiovascolare: stile di vita, fattori legati al virus, effetti collaterali a lungo termine della terapia antiretrovirale, immunoattivazione ed immunosenescenza.

Oltre ai tradizionali fattori di rischio quali fumo, dislipidemia, pressione arteriosa, iperglicemia, si riconoscono fattori di rischio specifici per l'HIV. La stessa replicazione virale determina un'aumentata infiammazione sistemica con conseguente disfunzione endoteliale ed effetto pro-aterogenico. La terapia antiretrovirale, invece, se da un lato determina alterazioni dell'assetto metabolico con ipertrigliceridemia, ridotta tolleranza glucidica, lipodistrofia e quindi con effetto pro-aterogenico, dall'altro lato determina una riduzione della replicazione virale con conseguente riduzione dell'immunoattivazione e dell'immunosenescenza con effetto protettivo sulla parete vasale. Molto discusso è comunque il ruolo della replicazione virale residua e delle repliche virali transitorie nei pazienti soppressi in trattamento antiretrovirale che sembrerebbero perpetuare lo stato di immunoattivazione sebbene i meccanismi non siano ancora noti. Diversi studi hanno come target la riduzione della replicazione residua agendo ad

esempio sulla riduzione della traslocazione microbica intestinale o trattare le comorbidità quali infezione da CMV o l'epatite cronica HCV-relata (Hatano H.,2013).

Lo scenario della malattia cardiovascolare in corso di infezione da HIV è molto complesso dove virus, terapia ART, immunoattivazione ed immunosenescenza con le citochine pro-infiammatorie hanno un ruolo preponderante. Pertanto, è necessario sempre di più agire sia sui tradizionali fattori di rischio ma anche su quelli non convenzionali e trovare nuove metodiche in grado di evidenziare il danno vascolare precoce nella popolazione HIV positiva asintomatica.

In questo ambito, fattori solubili come l'Osteoprotegerina potrebbero rappresentare markers biologici alternativi e precoci per la valutazione del danno cardiovascolare in corso di infezione da HIV.

BIBLIOGRAFIA

- Austen WG., Edwards JE., Frye RL., Gensini GG., Gott VL. et al: A reporting system on patients evaluated for coronary artery disease. Report of the Ad Hoc Committee for grading of coronary artery disease, Council on Cardiovascular Surgery, American Heart Association. *Circulation*. 1975; 5:15–40.
- Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A: Abnormal cytokine production by circulating monocytes and dendritic cells of myeloid origin in ART-treated HIV-1+ patients relates to CD4+ T-cell recovery and HCV co-infection. *Curr HIV Res*. 2007 May;5(3):325-36.
- Ben-Romano R., Rudich A., Torok D., et al. Agent and cells – type specificità in the induction of insulin resistance by HIV protease inhibitors. *AIDS* (2003; 17: 23 – 32).
- Bennett BJ., Scatena M., Kirk EA., Rattazzi M., Varon RM. et al: Osteoprotegerin Inactivation Accelerates Advanced Atherosclerotic Lesion Progression and Calcification In Older Apoe^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.2006; 26: 2117-2124.
- Biasillo G., Leo M., Della Bona R. and Biasucci L.M. : Inflammatory biomarkers and coronary heart disease: from bench to bedside and back. *Intern Emerg Med*. 2010; 5:225-233.
- Boyce Brendan F., Xing Lianping: Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modelling and remodelling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008; 473 139-146.

- Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ et al: CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2004 Sep 20;200(6):749-59.
- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S et al: Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006 Dec;12(12):1365-71.
- Cerqueira MD., Weissman NJ., Dilsizian V., Jacobs AK., Kaul S. et al, American Heart Association Writing Group on Myocardial Segmentation and Registration for Cardiac Imaging: Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: a statement for health –care professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on clinical Cardiology of the American heart Association. *Circulation*. 2002; 105:539-42.
- Chakravarti et al: Normal human primary CD4+ T lymphocytes synthesize and release functional osteoprotegerin in vitro. *Laboratory investigation* (2008) 88,171-184.
- Cheng X., Kinosaki M., Murali R and Greene M.I.: The TNF Receptor Superfamily. Role in Immune Inflammation and Bone Formation. *Immunologic Research*. 2003; 27/2-3:287-294.
- Coll B., Parra S., Alonso-Villaverde C., Aragonés G., Montero M. et al: The role of Immunity and Inflammation in the Progression of

Atherosclerosis in Patients with HIV Infection. *Stroke*. 2007; 38:2477-2484.

- Collin-Osdoby P.: Regulation of Vascular calcification by osteoclast Regulatory factors RANKL and Osteoprotegerin. *Circulation Research*. 2004; 26;95(11):1046
- Currier JS.:Update on cardiovascular complications in HIV infection. *Top HIV Med*. 2009 Jul-Aug;17(3):98-103.
- D'Agostino R., Ramachandran S. Vasan, Michael J. Pencina, Philip A. Wolf et al: General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care. The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008;117:743-753.
- Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY: Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2010 Jun;29(2):273-83.
- Deeks SG: Immune dysfunction, inflammation, and accelerated aging in patients on antiretroviral therapy. *Top HIV Med*. 2009; 17(4):118-23.
- Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med*. 2011;62:141-55.
- d'Ettorre G., Francone M., Mancone M., Ceccarelli G., Ascarelli A. et al: Significant coronary stenosis detected by coronary computed angiography in asymptomatic HIV infected subjects. *Journal of Infection*. 2012; 64(1):82-8.
- Douek DC: Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease.. *AIDS Rev*. 2003 Jul-Sep;5(3):172-7.

- Effros RB. Loss of CD28 expression on T lymphocytes: a marker of replicative senescence. *Dev Comp Immunol.* 1997 Nov-Dec;21(6):471-8.
- Ferrando-Martínez S, Ruiz-Mateos E, Romero-Sánchez MC, Muñoz-Fernández MÁ, Viciano P, Genebat M et al: HIV infection-related premature immunosenescence: high rates of immune exhaustion after short time of infection. *Curr HIV Res.* 2011 Jul;9(5):289-94.
- Gamadia LE, van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Yong SL, Surachno S, Wertheim-van Dillen PM et al: The size and phenotype of virus-specific T cell populations is determined by repetitive antigenic stimulation and environmental cytokines. *J Immunol.* 2004 May 15;172(10):6107-14.
- Grunfeld C, Delaney JA, Wanke C, Currier JS, Scherzer R, Biggs ML et al: Preclinical atherosclerosis due to HIV infection: carotid intima-medial thickness measurements from the FRAM study. *AIDS.* 2009 Sep 10;23(14):1841-9.
- Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. DHHS 2013.
- Guzman-Fulgencio M., Medrano J., Rallon N., Echeverria-Urabayen A., Benito J.M. et al: Soluble markers of inflammation are associated with Framingham score in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *Journal of Infection.* 2011; 63(5):382-90.

- Hakeem A., Bhatti S, Cilingiroglu M.: The Spectrum of Atherosclerotic Coronary artery Disease in HIV Patients. *Curr Atheroscler Res.* 2010; 12:119-124.
- Hakim FT, Gress RE: Immunosenescence: immune deficits in the elderly and therapeutic strategies to enhance immune competence. *Expert Rev Clin Immunol.* 2005 Sep;1(3):443-58.
- Hamilton-craig C.R Friedman D., Achenbach S. : Cardiac Computed Tomography-Evidence, Limitations and Clinical Application. *Heart, Lung and Circulation* 2012 Feb; 21(2):70-81.
- Hatano H: Immune activation and HIV persistence: considerations for novel therapeutic interventions. *Curr Opin HIV AIDS.* 2013 May;8:211-6.
- Herbert C. Stary, A. Bleakley Chandler, Robert E. Dinsmore, Valentin Fuster, Seymour Glagov, William Insull Jr, et al: A definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. *Circulation and Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1994
- Hofbauer L. C., Schoppet M.: Clinical Implication of the Osteoprotegerin/RANKL/RANK System for bone and vascular disease. *JAMA.* 2004; 292(4):490-5.
- Hsue P.,Y., Lo J.C., Franklin A., et al. Progression of atherosclerosis as assessed by carotid intima-media thickness in patients with HIV infection. *Circulation* (2004; 109: 1603-8).

- Hunt PW, Landay AL, Sinclair E, Martinson JA, Hatano H, Ewuji B et al: A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers. *PLoS One*. 2011 Jan 31;6(1):e15924.
- Hwang JJ., Wei J., Abbara S., Grinspoon SK., Lo J.: Receptor activator of nuclear factor kappa β ligand (RANKL) and its relationship to coronary atherosclerosis in HIV patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012; 61(3):359-63.
- Kestens L, Vanham G, Gigase P, Young G, Hannebly I, Vanlangendonck F :Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection *AIDS*. 1992 Aug;6(8):793-7.
- King SB 3rd, Smith SC Jr, Hirshfeld JW Jr, Jacobs AK, Morrison DA et al: Focused update of the ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines: 2007 Writing group to review new evidence and update the ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention, writing on behalf of the 2005 writing committee. *Circulation*, 2008; 117: 261–295.
- Kiechl S., Werner P., Knoflach M., Furtner M., Willeit J. et al: The Osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2006; 4(6):801-11.

- Le Saux S, Weyand CM, Goronzy JJ. Mechanisms of immunosenescence: lessons from models of accelerated immune aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Jan;1247:69-82.
- Lichtner et al: Increased carotid intima media thickness is associated with depletion of circulating myeloid dendritic cell in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral treatment. *Atherosclerosis* 204(2009) e1-e3.
- Lieb W., Gona P., Larson MG., Massaro JM., Lipinska I. et al: Biomarkers of the Osteoprotegerin pathway. Clinical correlates, subclinical disease, incident cardiovascular disease and mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:1849-1854
- Lo J., Abbara S., Shturman L., Soni A., Wei J. et al: Increased prevalence of subclinical coronary atherosclerosis detected by coronary computed tomography angiography in HIV-infected men. *AIDS.* 2010; 24:243-253.
- Lorenz M.W., Stephan C., Harmjanz A., Staszewski S., Buehler A. et al: Both long-term HIV infection and highly active antiretroviral therapy are independent risk factors for early carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2008; 196 720-726.
- Melander O., Newton-Cheh C., Almgren P., Hedblad B., Berglund G. et al: Novel and Conventional Biomarkers for Prediction of Incident Cardiovascular Events in The Community. *JAMA.* 2009; 302(1):49-57.
- Montecucco F., Steffens S. and Mach F.: The immune Response is involved in Atherosclerotic plaque calcification: could the

RANKL/RANK/OPG System be a marker of plaque instability?

Clinical and Developmental Immunology. 2007;2007:75805

- Nakanjako D, Ssewanyana I, Mayanja-Kizza H, Kiragga A, Colebunders R, Manabe YC, et al: High T-cell immune activation and immune exhaustion among individuals with suboptimal CD4 recovery after 4 years of antiretroviral therapy in an African cohort. BMC Infect Dis. 2011 Feb 8;11:43.
- Papagno L, Spina CA, Marchant A, Salio M, Rufer N, Little S et al: Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. PLoS Biol. 2004 Feb;2(2):E20. Epub 2004 Feb 17.
- Patel MR., Dehmer GJ., Hirshfeld JW., Smith PK., Spertus JA et al.; American College of Cardiology Foundation Appropriateness Criteria Task Force; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society of Thoracic Surgeons; American Association for Thoracic Surgery; American Heart Association, and the American Society of Nuclear Cardiology Endorsed by the American Society of Echocardiography; Heart Failure Society of America; Society of Cardiovascular Computed Tomography: ACCF/SCAI/STS/AATS/AHA/ASNC 2009 appropriateness criteria for coronary revascularization: a report by the American College of Cardiology Foundation Appropriateness Criteria Task Force; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Thoracic Surgeons, American Association for Thoracic Surgery, American Heart Association, and the American Society of Nuclear Cardiology endorsed by the American Society of Echocardiography,

the Heart Failure Society of America, and the Society of Cardiovascular Computed Tomography. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53:530–553.

- Penny Reid et al: Pathophysiological roles of osteoprotegerin. *European Journal of Cell Biology*(2008).
- Periard D., Telenti A., Sudre P., et al. Atherogenic dyslipidemia in HIV – infected individuals treated with protease inhibitors. *Circulation* (1999; 100: 700-5).
- Peter Libby; Paul M. Ridker; Attilio Maseri: Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-1143.
- Quercioli A., Luciano Viviani G., Dallegri F., Mach F., Montecucco F.: Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B ligand/Osteoprotegerin Pathway is A Promising Target To reduce Atherosclerotic Plaque Calcification. *Crit Pathways in Cardiol*. 2010; 9:227-230.
- Ross A.C., Rizk N., O’Riordan M.A., Dogra V., El-Bejjani D. et al: Relationship between Inflammatory Markers, Endothelial activation Markers, and Carotid Intima-Media Thickness in HIV-Infected patients Receiving Antiretroviral Therapy. *Clinical Infectious Disease*. 2009; 49:1119-27.
- Schoppet M., Sattler AM., Schaefer JR., Herzum M., Maisch B. et al: Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(3):1024-8.

- Stejskal D., Bartek J., Pastorková R., Růžicka V., Oral I. et al: Osteoprotegerin RANK, RANKL Biomed. Papers 2001;145(2), 61-64.
- Stein J.H., Klein M.A., Bellehumeur J.L., et al. Use of human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors is associated with atherogenic lipoprotein changes and endothelial dysfunction. *Circulation* (2001; 104: 257 – 62).
- Tassiopoulos K, Landay A, Collier AC, Connick E, Deeks SG, Hunt P et al: CD28-negative CD4+ and CD8+ T cells in antiretroviral therapy-naive HIV-infected adults enrolled in adult clinical trials group studies. *J Infect Dis.* 2012 Jun;205(11):1730-8.
- Van Campenhout A., Golledge J: Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2009; 204(2):321-9.
- Veazey RS, Klasse PJ, Ketas TJ, Reeves JD, Piatak M Jr, Kunstman K et al: Use of a small molecule CCR5 inhibitor in macaques to treat simian immunodeficiency virus infection or prevent simian-human immunodeficiency virus infection. *J Exp Med.* 2003 Nov 17;198(10):1551-62.
- Vik A., Mathiesen EB., Brox J., Wilsgaard T., Njølstad I. et al: Serum osteoprotegerin is a predictor for incident cardiovascular disease and mortality in a general population: the Tromsø Study. *J Thromb Haemost.* 2011; 9(4):638-44.
- Weiwei et al: IL-17 induces myocardial fibrosis and enhances RANKL/OPG and MMP/TIMP signalling in isoproterenol-induced heart failure. *Experimental and molecular Pathology.* 2009.

- Worm S.W. and Hsue P.: Role of biomarkers in predicting CVD risk in the setting of HIV infection? *Current Opinion In HIV and AIDS*. 2010; 5:467-472.
- Wright HL., McCarthy HS., Middleton J. and Marshall MJ.: RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2009; 2:56-64.