



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive

XXXII Ciclo di Dottorato in Malattie Infettive

STRUMENTI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO
CARDIOVASCOLARE IN RELAZIONE ALLO STATO DI
ATEROMASIA CORONARICA IN SOGGETTI
CON INFEZIONE DA HIV

Tutors

Prof. Claudio Maria Mastroianni

Prof.ssa Gabriella d'Ettore

Candidato

Dott. Eugenio Nelson Cavallari

INDICE

PARTE I

- EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE DA HIV.....5
- PATOGENESI DELL'INFEZIONE DA HIV.....7
- IMMUNOSENESCENZA E COMORBIDITÀ.....12
- TERAPIA ANTIRETROVIRALE.....13
- ATEROSCLEROSI.....18
- INFEZIONE DA HIV E MALATTIA CARDIOVASCOLARE.....21
- MATRICE CARDIACA EXTRACELLULARE E FIBROSI
MIOCARDICA.....27
- MISURAZIONE RADIOLOGICA DELLA FIBROSI MIOCARDICA.....31

PARTE II

- PREMESSA E OBIETTIVI DELLO STUDIO.....34
- MATERIALI E METODI.....35
 - *Popolazione dello studio*.....35
 - *Parametri biometrici, clinici, biochimici*.....36
 - *Esami strumentali*.....36
 - *Altri parametri*.....39
 - *Analisi statistica*.....39
- RISULTATI.....40
 - *Caratteristiche della popolazione studiata*40

· <i>Score di rischio cardiovascolare</i>	41
· <i>Platelets to Lymphocytes Ratio e Neutrophils to Lymphocytes Ratio</i>	44
· <i>Spessore mio-intimale carotideo</i>	45
· <i>Ateromasia dell'albero coronarico</i>	47
· <i>Agatston Calcium Score</i>	51
· <i>Proteina C Reattiva ad elevata sensibilità</i>	52
· <i>Volume extracellulare</i>	52
· <i>Follow-up</i>	56
• CONCLUSIONI.....	57
• BIBLIOGRAFIA.....	65

PARTE I

EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE DA HIV

Da migliaia di anni a questa parte, una moltitudine di ceppi di SIV (Simian Immunodeficiency Virus) infetta endemicamente più di 40 specie di primati non umani del continente africano. Ripetuti episodi di salto di specie hanno infine portato alla nascita dell'infezione umana da virus dell'immunodeficienza acquisita (Human Immunodeficiency Virus – HIV), una zoonosi originariamente trasmessa all'uomo proprio dai primati africani. HIV-1 è diretto discendente del virus SIV_{cpz} (il SIV degli scimpanzé), mentre HIV-2 discende dal virus SIV_{sm} (il SIV dei Sooty mangabeis). Fino ad oggi sono stati riconosciuti quattro gruppi di HIV-1, ciascuno dei quali corrisponde a un distinto episodio di salto di specie; nello specifico, tre di questi sono originati dagli scimpanzé (gruppi M, N e O) e uno dai gorilla (gruppo P). L'attuale pandemia di HIV riconosce come agente eziologico prevalente HIV di gruppo M, il cui salto di specie è stato datato a circa 100 anni fa. All'interno di questo gruppo si riconoscono nove sottogruppi (A-D, F-H, J e K), tra i quali il B rappresenta quello prevalente alle nostre latitudini. HIV-2 è maggiormente diffuso nei paesi dell'Africa occidentale, in Portogallo, India e Brasile ^[1].

Le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità indicano che nel 2018 gli individui con infezione da HIV erano circa 37.9 milioni e che nello stesso anno i decessi legati all'infezione a livello globale sono stati 770000. Alla fine del 2014 erano 36,9 milioni le persone nel mondo con infezione da HIV e i decessi sono stati 1,2. Nel 2017 le nuove diagnosi sono state 1,8 milioni, di cui 1,6 milioni di adulti e 180000 giovani al di sotto di 15 anni. La maggior parte delle nuove infezioni e dei

decessi per HIV si registrano nell'Africa sub-sahariana, seguita dal continente asiatico e dall'America centro-meridionale. La prevalenza globale di questa infezione ha visto un progressivo aumento a partire dal 2002, come conseguenza dell'espansione dell'uso e dell'accesso alla terapia antiretrovirale e al conseguente aumento della sopravvivenza dei pazienti. La principale causa di morte nella popolazione HIV positiva residente nei paesi in via di sviluppo è rappresentata dalla co-infezione tubercolare. Al contrario, nei paesi industrializzati circa il 50% dei decessi tra le persone con infezione da HIV in trattamento antiretrovirale (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART) è causato dalle malattie cardiovascolari, dalle neoplasie non AIDS correlate e dalla malattia epatica [2].

In Italia tra il 2010 e il 2017 sono stati registrati 30413 nuovi casi di infezione da HIV; la maggiore incidenza di nuove infezioni si è registrata in Lombardia, seguita dal Lazio e dall'Emilia-Romagna. L'incidenza annuale stimata a livello nazionale nel 2017 è stata pari a 5.7/100000. Il 23.8% delle nuove infezioni del 2017 si sono registrate in soggetti di sesso femminile. L'età media alla diagnosi è stata di 39 anni nei maschi e 34 anni per le femmine. La proporzione di nuove infezioni nei soggetti di sesso maschile aumenta all'aumentare dell'età, al di sopra dei 70 anni i maschi rappresentano il 96.4% dei casi. La più elevata percentuale di trasmissione legata a rapporti sessuali tra uomini si riscontra nella fascia di età 20-29 anni, mentre una trasmissione in soggetti di sesso maschile legata a rapporti eterosessuali si riscontra soprattutto nelle fasce di età 60-69 anni e ≥ 70 anni. A differenza delle altre fasce di età, tra i 15 e i 24 anni il numero di nuove infezioni nei soggetti di sesso femminile è superiore rispetto a quelle registrate nei maschi. La principale via di trasmissione dell'infezione risulta essere quella sessuale; i rapporti eterosessuali rappresentano al momento la tipologia di rapporto maggiormente implicata. Nel 36.1% delle nuove

infezioni nel 2017, i CD4 alla diagnosi sono risultati <200 cellule/ μ L, mentre nel 55.8% dei casi la conta linfocitaria CD4 è risultata <350 cellule/ μ L. A fronte di una sostanziale stabilità nel tempo in termini assoluti, la percentuale di nuove diagnosi negli stranieri residenti in Italia è andata progressivamente aumentando tra il 2010 e il 2017, sino a valori intorno a 34.4%. L'età media alla diagnosi negli stranieri di sesso maschile è di 32 per i maschi e 30 per le femmine. Anche in questo caso, i rapporti eterosessuali risultano essere la più frequente modalità di trasmissione [3].

PATOGENESI DELL'INFEZIONE DA HIV

HIV è un virus a RNA, appartenente alla famiglia dei Retroviridae, famiglia Lentivirus. Il genoma di HIV è composto da 9 kilobasi e comprende 9 differenti geni che codificano per un totale di 15 proteine. L'ingresso del virus all'interno della cellula dell'ospite si realizza attraverso la fusione dell'envelope virale con la membrana plasmatica della cellula dell'ospite. Il processo di fusione e d'ingresso è guidato dall'interazione delle proteine dell'envelope gp120 e gp41 con il recettore di superficie CD4 e con un subset specifico di recettori per le chemochine (CCR5 e CXCR4) aventi funzione di co-recettore, i quali sono presenti sulla membrana plasmatica dei linfociti T e di altre popolazioni cellulari quali ad esempio i monociti, le cellule di Langherans, le cellule dendritiche, le cellule della glia e le cellule retiniche. Una volta entrato nel citoplasma cellulare, HIV va incontro a un processo di uncoating e di retro-trascrizione del proprio genoma e alla formazione del cosiddetto complesso di pre-integrazione, il quale è in grado di attraversare la membrana nucleare. Una volta raggiunto il nucleo cellulare, il DNA provirale va incontro a integrazione all'interno del genoma della cellula ospite, venendo così trascritto da parte dell'apparato trascrizionale della cellula ospite ogni qualvolta

questa andrà incontro ad attivazione. Inoltre, osservazioni sperimentali suggeriscono che HIV sia in grado di infettare tipi cellulari che non esprimono il recettore CD4; è inoltre nota la possibilità di trasmissione virale cellula-cellula (la cosiddetta sinapsi virologica), attraverso la quale anche virioni immaturi possono essere trasferiti tra il citoplasma di due cellule adiacenti [4-10].

Circa il 10-50% delle infezioni acute da HIV si presentano in maniera sintomatica (febbre, linfadenomegalie, cefalea, dolore retrobulbare, mialgie, faringodinia, rash cutaneo). In seguito all'ingresso di HIV nell'organismo si osserva un rapido incremento nel numero di linfociti T CD8+, il che riflette l'espansione della popolazione delle cellule T CD8+ della memoria, a discapito della popolazione T CD8+ naïve, sebbene il numero assoluto di queste ultime si mantenga a lungo normale durante l'evoluzione dell'infezione. I linfociti T CD8+ citotossici svolgono un ruolo fondamentale nel controllo della replicazione di HIV in quanto in grado di inibire la replicazione virale attraverso la lisi anticorpo-dipendente delle cellule infette, oltre che attraverso la produzione di fattori solubili e chemochine (TNF- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES). La replicazione di HIV avviene principalmente all'interno dei linfociti T CD4+ attivati. Questi si differenziano in due diverse popolazioni: Th1 e Th2, a seconda del profilo di secrezione citochinica. I primi sono deputati alla produzione di IFN- γ , IL-2, IL-12 e IL-15, molecole ad attività pro-infiammatoria, e sono maggiormente implicati nella risposta contro i patogeni intracellulari; al contrario, la risposta Th2 è caratterizzata dalla produzione di molecole ad attività antiinfiammatoria quali IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 ed è implicata nella risposta verso i patogeni extracellulari. In corso d'infezione da HIV si osserva uno squilibrio della risposta CD4 in favore del profilo Th1. I linfociti T CD4 dei soggetti con infezione da HIV presentano alcune peculiari alterazioni

funzionali: ridotta capacità di andare in contro a divisione cellulare, progressiva perdita di responsività verso richiami antigenici, ridotta espressione di IL-2 [10-18].

La risposta dei linfociti B in corso d'infezione da HIV è caratterizzata da un'iperattivazione, ma contemporaneamente anche da una ridotta capacità di generare una risposta efficace, ed infatti è di comune riscontro un'ipergammaglobulinemia policlonale in cui solo una parte degli anticorpi prodotti sono diretti contro HIV. Per via della mancanza di attività di correzione di bozze della trascrittasi inversa, HIV presenta una grande variabilità antigenica e sfugge rapidamente all'azione neutralizzante degli anticorpi prodotti. Al contrario, una minoranza di soggetti sviluppa nel corso dell'infezione degli anticorpi diretti contro epitopi altamente conservati della glicoproteina virale Env; questi anticorpi risultano in grado di neutralizzare diversi clades virali (broadly neutralizing antibodies) e proprio verso questi anticorpi si è concentrata la ricerca per la creazione di un vaccino anti-HIV. Anche i monociti/macrofagi sono suscettibili all'infezione da parte di HIV, andando in questo modo incontro ad alterazioni delle proprie normali attività immunologiche: i monociti circolanti dei soggetti con infezione da HIV mostrano una ridotta capacità di presentazione dell'antigene e di differenziazione, mentre i macrofagi mostrano un'alterata capacità di fagocitosi e di killing intracellulare. I macrofagi tissutali contribuiscono inoltre alla iper-produzione di mediatori proinfiammatori quali TNF, IL-1, IL-6 e IL-10. Le cellule dendritiche, migrando dalle mucose verso i linfonodi, svolgono un ruolo chiave nella presentazione degli antigeni di derivazione virale ai linfociti B e T. Il numero e la funzione delle cellule dendritiche mieloidi e plasmocitoidi circolanti è ridotto nei soggetti con infezione da HIV. Anche i linfociti NK mostrano un'alterata funzionalità in corso di infezione da HIV, legata ad un deficit nelle capacità citolitiche. Allo stesso modo, i linfociti γ - δ , implicati sia nella

risposta immunitaria innata che in quella adattativa e che mostrano normalmente la capacità di riconoscere gli antigeni estranei indipendentemente dalla presentazione con HLA, nell'ambito dell'infezione da HIV presentano un'alterazione dell'attività citolitica [17-20].

Nel corso dell'infezione da HIV si vengono a costituire due distinti compartimenti virologici: uno attivo in cui il virus va incontro a replicazione con continua infezione di nuove cellule e un compartimento di latenza che è costituito dal provirus integrato all'interno di cellule quiescenti (resting cells) e dal virus infettante cellule localizzate nei così detti santuari immunologici (tessuti che per ragioni fisiologiche sono caratterizzati da una pressoché assente componente immunologica, come ad esempio il sistema nervoso centrale e le gonadi). Il pool di resting CD4⁺ T cells infette viene a stabilirsi sin dalle prime fasi dell'infezione. È stato stimato che circa 10^5 - 10^7 CD4⁺ resting T cells (meno dello 0,05% delle cellule resting T CD4⁺ presenti nell'organismo) albergano il genoma provirale durante la fase di latenza clinica della malattia. I linfociti T della memoria (linfociti T central memory ed effector memory) costituiscono un reservoir ideale per il mantenimento del genoma di HIV, per via della loro lunga sopravvivenza. Inoltre, queste cellule, seppure quiescenti, permettono una minima attività di replicazione virale non sufficiente a determinare un danno citopatico e in questo modo contribuiscono anche a mantenere il pool di cellule attivamente infette. I linfociti T della memoria, una volta attivati, sono capaci di generare una grande quantità di nuovi virioni. I linfociti T naïve svolgono invece un importante ruolo nel mantenimento del reservoir virologico, nonostante la ridotta durata di vita. Anche i monociti/macrofagi contribuiscono alla costituzione del reservoir virale: i macrofagi tissutali infatti sono permissivi verso bassi livelli di replicazione virale e possono sopravvivere anche per diversi mesi,

queste cellule inoltre esprimono livelli ridotti di proteine virali sulla propria superficie potendo quindi sfuggire con maggiore facilità al controllo immunologico, oltre ad essere anche in grado di trasmettere il virus attraverso sinapsi virologica. I macrofagi nel sistema nervoso centrale (perivascolari, meningei, del plesso coroidario e le cellule della microglia) derivano da sistema monocito/macrofagico e possono essere infettati da HIV. La loro velocità di turnover è variabile e conseguentemente anche il loro peso nel mantenimento del reservoir di cellule latentemente infette. I macrofagi perivascolari e le cellule microgliali sono fortemente implicati nella patogenesi della demenza associata all'infezione da HIV. Altre popolazioni cellulari rilevanti per la formazione e il mantenimento del reservoir virale sono le cellule dendritiche, le cellule dendritiche follicolari, gli astrociti e le cellule progenitrici emopoietiche [21,22].

Lo stato di immunoattivazione cronica proprio dell'infezione da HIV, caratterizzato da un'iperproduzione di citochine proinfiammatorie (quali ad esempio TNF- α , IL-1 β , IL-6), non è giustificabile in ragione dalla sola stimolazione antigenica legata alla presenza del virus, come suggerito dal fatto che dopo l'inizio della terapia antiretrovirale i soggetti con infezione da HIV non mostrano una significativa riduzione dei valori dei sopracitati mediatori proinfiammatori. HIV è in grado di stimolare la risposta immune innata attraverso la stimolazione dei pattern recognition receptors, come ad esempio i Toll-like receptors 7 e 9, espressi sulle cellule dendritiche plasmocitoidi; in aggiunta a ciò, le proteine virali gp120, Tat e Nef svolgono un'attività proinfiammatoria diretta. A distanza di poche ore dal suo ingresso nell'organismo, HIV invade il tessuto linfatico associato alla mucosa intestinale provocando una profonda deplezione locale di linfociti T e in particolare della popolazione Th17, cellule produttrici di IL-17, ovvero una citochina ritenuta

fondamentale nel garantire il mantenimento dell'integrità della barriera intestinale [23-26]. La deplezione dei Th17 si associa quindi ad un incremento della traslocazione di prodotti di derivazione batterica (LPS e flagellina) nella circolazione sistemica con una conseguente attivazione macrofagica e B linfocitaria di cloni non HIV-specifici, mediata dai Toll-like receptors. Nei soggetti con infezione da HIV si possono osservare, specialmente nelle fasi avanzate di malattia, riattivazioni di patogeni latenti come ad esempio gli herpes virus (Citomegalovirus e virus di Epstein Barr), con la conseguente attivazione dei cloni T cellulari specifici. Infine, negli individui con infezione da HIV, si assiste a un'alterazione dei meccanismi immunoregolatori come ad esempio l'attività dei linfociti T regolatori e la secrezione di IL-10 [27-30].

IMMUNOSENESCENZA E COMORBIDITÀ

Il sistema immunitario, al pari degli altri organi e apparati, va incontro, nel corso della vita, ad un processo fisiologico di invecchiamento: le cellule staminali emopoietiche si riducono per quantità e funzionalità, il timo subisce una progressiva involuzione portando così a una riduzione del numero di linfociti T naïve circolanti e ad un aumento della proporzione di linfociti T della memoria CD28- (co-recettore implicato nell'attivazione della risposta T cellulare) che presentano un limitato potenziale proliferativo e una ridotta polifunzionalità, aumenta la concentrazione di mediatori proinfiammatori quali TNF- α e IL-6 e si riduce il rapporto CD4/CD8 tra i linfociti T circolanti [31-35]. Parallelamente, si osserva una riduzione nella funzionalità delle cellule della risposta immunitaria innata. I dati disponibili suggeriscono inoltre che analoghi cambiamenti si verificano anche a livello delle mucose. Analoghe alterazioni immunitarie sono riscontrabili precocemente nei

soggetti con infezione da HIV, indipendentemente dalla terapia antiretrovirale. Questi tratti di immunosenescenza sono di più comune osservazione tra coloro i quali non ottengono un soddisfacente recupero dei CD4 dopo l'inizio del trattamento. La conta di linfociti T CD4+ è un forte predittore di morbilità correlata alle patologie non-AIDS correlate e infatti i pazienti che non raggiungono un soddisfacente valore di CD4 in corso di terapia presentano un maggior rischio di sviluppare precocemente le patologie legate all'invecchiamento [36-41].

Le cellule normali non sono in grado di proliferare indefinitamente e dopo circa 40-60 divisioni cellulari (il così detto limite di Hayflick) si instaura uno stato di senescenza replicativa caratterizzato dalla riduzione della lunghezza dei telomeri (sequenze ripetute di DNA localizzate all'estremità dei cromosomi). Anche l'accumulo di danni a carico del materiale genico nucleare o mitocondriale può influenzare la senescenza cellulare ed eventualmente indurre apoptosi. Gli individui con infezione da HIV mostrano, rispetto alla popolazione generale, un precoce accorciamento dei telomeri. L'accumulo di cellule immunitarie senescenti è stato correlato all'insorgenza di malattie cardiovascolari, di patologie autoimmunitarie, alla ridotta risposta ai vaccini propria dei soggetti anziani e, nell'ambito della popolazione HIV positiva, alla progressione verso una condizione di AIDS. In definitiva, il precoce invecchiamento immunitario del soggetto HIV positivo si associa al rischio di sviluppare precocemente le condizioni cliniche associate all'età anziana quali fragilità, malattia cardiovascolare, alterazioni cognitive, neoplasie, insufficienza renale e osteoporosi [42-45].

TERAPIA ANTIRETROVIRALE

La più rilevante evoluzione medica nell'ambito dell'infezione da HIV è stata sicuramente rappresentata dall'avvento dei farmaci antiretrovirali, grazie ai quali è stato possibile ridurre il tasso di progressione verso la condizione di AIDS, ridurre la morbilità e la mortalità dei pazienti, ridurre l'incidenza e modificare lo spettro delle malattie neoplastiche ed infettive associate all'infezione. Inoltre, un ruolo fondamentale svolto dalla terapia antiretrovirale, risiede nella riduzione del rischio di trasmissione dell'infezione; infatti abbattendo la replicazione virale si riduce drasticamente il rischio di trasmissione di HIV [46].

Sino alla metà degli anni Novanta la disponibilità di molecole ad attività antiretrovirale era scarsa e i trattamenti erano costituiti dall'utilizzo di singoli farmaci somministrati sequenzialmente. A partire dal 1996, dopo l'avvento degli inibitori delle proteasi di HIV e con l'inizio della terapia antiretrovirale di combinazione (cART), o terapia antiretrovirale altamente efficace (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART), si è osservato un notevole incremento nella efficacia e nella durevolezza della terapia antiretrovirale. La scelta di usare una combinazione di almeno tre farmaci efficaci è derivata dallo studio di modelli matematici elaborati partendo da alcune nozioni: nei soggetti con infezione da HIV in assenza di terapia la produzione giornaliera di particelle virali ammonta a circa 10^{10} unità, il genoma di HIV è costituito all'incirca da 10^4 nucleotidi, il tasso di errore replicativo della retro trascrittasi virale è stimato in una mutazione ogni 10^3 - 10^4 nucleotidi sintetizzati, con un quantitativo stimato di mutazioni tra 1 e 10 nel corso di ciascun ciclo replicativo virale. In considerazione di ciò, è altamente probabile che si vengano a generare quasi-specie virali con ridotta sensibilità verso uno o due qualunque farmaci antiretrovirali anche in assenza di pressione farmacologica. Se assunta con un'adeguata aderenza, la cART è in grado di

assicurare una soppressione della replicazione virale per decenni, favorendo così un recupero quantitativo e qualitativo dei linfociti T CD4 e in definitiva prolungando l'aspettativa di vita dei soggetti con infezione da HIV. Tuttavia, la cART non è in grado di eradicare il virus dall'organismo, pertanto l'assunzione dei farmaci deve essere portata avanti per tutto il corso della vita del paziente. Diversi fattori sono in grado di minare l'efficacia della cART, tra questi riconosciamo la difficoltà del paziente di mantenere una buona aderenza a lungo termine, la ridotta tollerabilità di alcuni antiretrovirali nel breve o nel lungo termine, la possibilità di interazioni farmacologiche che riducano la biodisponibilità degli antiretrovirali, la ridotta penetrazione dei farmaci in alcuni distretti dell'organismo (ad esempio il sistema nervoso centrale). Tutti questi fattori possono comportare l'insorgenza di mutazioni di resistenza da parte del virus e un conseguente fallimento terapeutico.

I farmaci antiretrovirali sono classificati in base al proprio meccanismo d'azione e alla fase del ciclo replicativo di HIV con la quale interagiscono e vengono suddivisi in:

- Inibitori nucleosidici/nucleotidici della trascrittasi inversa (NRTI): bloccano l'attività dell'enzima retrotrascrittasi virale che si occupa di tradurre l'RNA virale in una doppia elica di DNA lineare.
- Inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI): come gli NRTI, agiscono inibendo l'attività della retrotrascrittasi virale.
- Inibitori delle proteasi (PI): bloccano l'attività delle proteasi virali implicate nella maturazione delle proteine virali neosintetizzate.
- Inibitori dell'integrasi (INSTI): inibiscono il processo di integrazione del DNA virale all'interno del genoma dell'ospite.

- Antagonisti del co-recettore CCR5: prevengono l'ingresso dei ceppi di HIV CCR5-tropici all'interno del citoplasma, non hanno invece efficacia nei confronti dei ceppi virali CXCR4-tropici o dei ceppi con tropismo misto.
- Inibitori della fusione: prevengono la fusione dell'envelope virale con la membrana cellulare impedendo così l'ingresso del virus all'interno della cellula.

Tra le possibili variabili associate alla possibilità di manifestare reazioni avverse ai farmaci si riscontrano la razza, il sesso, l'età, il profilo genetico del paziente, l'assunzione concomitante di altri farmaci, l'assunzione di alcol e/o sostanze stupefacenti. Tra gli effetti indesiderati a breve termine è necessario menzionare: le reazioni da ipersensibilità ad abacavir (farmaco appartenente alla categoria NRTI) osservate nei soggetti portatori dell'allele HLA B57-01, l'epatotossicità della nevirapina (NNRTI), la tossicità pancreatica della didanosina (NRTI), la tossicità neuro-psichiatrica dell'efavirenz (NNRTI), il rischio di calcolosi renale associato all'uso di indinavir o atazanavir (PI). Di diversa natura sono invece gli effetti indesiderati che si possono verificare nel lungo periodo, tra questi meritano di essere menzionati: la lipodistrofia, l'insulino-resistenza, la dislipidemia, l'incremento dei lattati sierici e l'acidosi lattica, l'osteoporosi e l'osteonecrosi ^[47-49]. La lipodistrofia è un disturbo caratterizzato dalla redistribuzione del grasso corporeo caratterizzata dalla riduzione del tessuto adiposo del volto, dei glutei e degli arti e da lipoaccumulo in sede addominale e posteriormente alla base del collo (gibbo di bufalo). Questo disturbo è stato classicamente associato all'utilizzo degli NRTI e dei PI, sebbene si possa presentare in associazione all'assunzione di qualunque classe di antiretrovirali; l'appartenere alla razza caucasica, l'età avanzata e il sesso maschile sono associati ad un maggiore rischio di sviluppare questo disturbo. La prevalenza di insulino-resistenza nella popolazione HIV è maggiore rispetto alla popolazione

generale indipendentemente dal trattamento antiretrovirale, ad ogni modo successivamente all'introduzione della cART nella pratica clinica questa ha conosciuto un forte incremento. L'insulino-resistenza nei soggetti con infezione da HIV è dovuta a molteplici fattori: al virus di per sé, al meccanismo d'azione dei farmaci, alla steatosi epatica, alla lipodistrofia, all'alta concentrazione di citochine proinfiammatorie. La dislipidemia nel paziente HIV positivo è caratterizzata da ridotte concentrazioni di HDL, da elevati livelli di trigliceridi e dalla presenza di LDL particolarmente piccole e dense. Questa particolare forma di LDL va più facilmente incontro a ossidazione e, per via delle loro ridotte dimensioni, sono capaci di penetrare agilmente l'endotelio vascolare e di legarsi efficacemente ai proteoglicani della matrice extra cellulare, rimanendo così incorporate nella parete arteriosa. Anche per via di tale alterazione, i soggetti HIV positivi mostrano un incrementato rischio cardiovascolare rispetto alla popolazione generale. L'uso dei PI è risultato essere un fattore di rischio indipendente per episodi di angina e infarto del miocardio ^[50-55]. L'uso della cART è stato inoltre associato ad un rischio relativo pari al 27% per anno di presentare infarto del miocardio durante i primi 7 anni di assunzione del trattamento. Il rialzo dei lattati sierici e l'acidosi lattica si associano al trattamento con NRTI. L'incidenza annuale di questi disturbi nei pazienti che assumono NRTI è di 13,6-14,5/1000 pazienti nel caso dell'incremento dei lattati sierici e di 1,2-3,9/1000 per l'acidosi lattica. La stavudina e la didanosina sono le molecole maggiormente associate allo sviluppo di questo tipo di problemi. L'uso del tenofovir disoproxil fumarato è stato associato al rischio di danno tubulare renale e conseguente osteoporosi per via un'alterazione del metabolismo del calcio e del fosforo e a un iperparatiroidismo secondario. La necrosi asettica, già descritta nella popolazione HIV prima dell'avvento della cART, può classicamente interessare la

testa e i condili femorali, la testa dell'omero, la porzione prossimale della tibia, le ossa del polso o della mano. Il sesso maschile, l'età compresa tra 20 e 50 anni, un'infezione in fase avanzata e il presentare almeno uno dei fattori di rischio per osteonecrosi validi nella popolazione generale (uso di steroidi, abuso alcolico, ipertrigliceridemia, malattie autoimmunitarie, pancreatite, gravidanza, traumi) sono tra i fattori di rischio riconosciuti per questa condizione [56-61].

ATEROSCLEROSI

Il termine “aterosclerosi” fu coniato nel 1829 ad opera del patologo francese Jean Lobstein per indicare il processo di perdita di elasticità cui vanno incontro i vasi arteriosi con il progredire dell'età. Successivamente, nel 1858, Rudolf Virchow descrisse per la prima volta la presenza di depositi intimali al livello arterioso. Oggi sappiamo che l'aterosclerosi è una patologia a carattere infiammatorio che affligge la parete delle arterie di grande e medio calibro, caratterizzata dalla presenza di una o più placche lipidiche fibro-infiammatorie, anche dette “ateromi”, costituite dall'accumulo a livello della tonaca intimale di cellule infiammatorie, cellule muscolari lisce, lipidi e tessuto connettivo. La formazione dell'ateroma è un processo dinamico che generalmente si sviluppa nel corso di decenni e il cui risultato finale è rappresentato dalla riduzione del calibro del vaso coinvolto. La principale complicanza dell'aterosclerosi delle arterie coronarie è l'infarto del miocardio, conseguente alla rottura dell'ateroma e all'occlusione completa del vaso interessato, che attualmente rappresenta la prima causa di morte negli Stati Uniti.

Il meccanismo patogenetico proposto per spiegare la formazione e la progressione della placca aterosclerotica è quello dalla così detta “risposta nei confronti del danno”. In questo caso il “danno” può essere costituito dallo stress emodinamico

sulla parete del vaso oppure dai fattori di rischio cardiovascolari quali ad esempio l'ipertensione, il diabete, l'ipercolesterolemia e il fumo (che esercita un'attività LDL-ossidante). È possibile suddividere la formazione dell'ateroma in fasi successive:

- Formazione della placca: come abbiamo detto, la formazione della placca è un processo lento e dinamico; in condizioni di normalità, le lesioni intimali che precedono l'ateroma si generano preferenzialmente nei tratti del vaso che sono sottoposti a un maggiore stress emodinamico (come ad esempio le biforcazioni), in queste sedi è infatti comune riscontrare segni di disfunzione endoteliale ed accumulo sub endoteliale di cellule muscolari lisce. Nelle persone che presentano fattori di rischio cardiovascolare la placca può insorgere in una molteplicità di sedi. L'endotelio rappresenta un vero e proprio organo biologicamente attivo che riveste un ruolo importante nel processo di aterogenesi. Quando viene attivato in conseguenza di un "danno" l'endotelio acquisisce la capacità di esprimere una varietà di molecole di adesione e chemochine, perdendo così la propria caratteristica di superficie teflon-like (FGF-2, fattore tissutale, endotelina e attivatore del plasminogeno sono molecole in grado di favorire l'aterogenesi). Il processo inizia con l'adesione dei monociti circolanti alla superficie endoteliale attraverso il legame con le molecole di adesione; successivamente, stimolati dalle chemochine espresse localmente, i monociti migrano a livello intimale dove si differenziano in cellule macrofagiche iniziando così a sintetizzare fattori di crescita quali PDGF, FGF, TNF, IL-1, IFN- α e TGF- β , molecole attivanti la proliferazione endoteliale e delle cellule muscolari lisce. Una volta all'interno della parete vascolare, i macrofagi attivano la propria attività fagocitica nei confronti delle molecole di LDL e dei detriti cellulari presenti nella tonaca intima della parete arteriosa, trasformandosi in cellule

schiumose (foam cells). Come effetto del micro-ambiente citochinico, l'endotelio può acquisire capacità pro-coagulative. Con il progredire della placca, si possono verificare fenomeni locali di micro-trombosi. A seguito di questi fenomeni trombotici si verifica un ulteriore rilascio di PDGF, che a sua volta induce proliferazione delle cellule muscolari lisce e il rilascio componenti della matrice extracellulare, portando così all'inclusione del trombo all'interno della placca in evoluzione. Poiché l'ossigeno diffonde con difficoltà nelle zone più profonde dell'ateroma, si vengono a determinare zone di necrosi nel contesto della parete vasale e inizia così un processo di neoangiogenesi a partenza dai vasa vasorum. Nelle fasi più tardive della maturazione dell'ateroma è possibile ritrovare al suo interno linfociti T e anticorpi diretti contro le LDL ossidate. Il risultato finale di tutto questo processo è una placca fibro-infiammatoria composta da un core necrotico separato dal torrente sanguineo da un cappuccio fibroso.

- Adattamento: la parete dell'arteria va incontro a un continuo rimodellamento al fine di mantenere un adeguato flusso ematico a valle della placca. Il rimodellamento è guidato dallo stress emodinamico locale e si attua attraverso un incremento del turnover delle cellule muscolari lisce e attraverso l'azione di molecole ad attività proteolitica che modificano la distribuzione della matrice extracellulare. Quando l'ostruzione ha raggiunto circa la metà del lume del vaso, questo meccanismo compensatorio perde la propria efficacia e viene così a determinarsi un assottigliamento del lume arterioso. Il rimodellamento è quindi un meccanismo compensatorio volto a prevenire l'insorgenza di stenosi critiche dell'albero arterioso, allo stesso tempo però questo meccanismo può provocare un ritardo nell'identificazione della presenza della placca.

- Fase clinica: l'evoluzione dell'ateroma prosegue anche quando esso oramai protrude all'interno del lume arterioso e il susseguirsi di episodi micro-emorragici al suo interno può ulteriormente aumentarne le dimensioni. Le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce dell'ateroma esprimono gli antigeni HLA DR, segno che queste sono andate incontro a fenomeni di attivazione immunologica. Alla fine, la placca può andare incontro a complicanze quali la calcificazione, la formazione di aneurismi, la fissurazione o l'ulcerazione. Una crescita stabile dell'ateroma può portare a un'occlusione completa del vaso con l'instaurarsi di circoli collaterali compensatori, senza quindi un correlato clinico, mentre la rottura improvvisa di una placca instabile anche di piccole dimensioni può provocare l'occlusione improvvisa del vaso causando infarto del miocardio ed eventualmente morte improvvisa [62-68].

INFEZIONE DA HIV E MALATTIA CARDIOVASCOLARE

Sia la risposta immunitaria innata che la risposta adattativa sono implicate nel processo di aterogenesi. La risposta innata coinvolge le cellule endoteliali e i monociti/macrofagi attraverso l'attivazione dei Pattern Recognition Receptors, tra i quali un ruolo di rilievo è svolto dai Toll-like receptors. La fagocitosi delle LDL ossidate attiva invece potenti mediatori infiammatori come ad esempio NF- κ B, Activator Protein-1 e l'Interferon Regulatory Factor-1. Anche la risposta innata e il processo di presentazione dell'antigene sono implicati nella maturazione dell'ateroma, come dimostrato da studi effettuati su modelli murini che hanno evidenziato come in mancanza di cellule B o di cellule T si osservi una ridotta aterogenesi. I linfociti T CD4 e CD8 sono abitualmente presenti nella placca ateromatosa ed è noto che le cellule Th1 e i loro prodotti, come ad esempio IFN- γ ,

svolgono attività aterogenetica. Di contro, le cellule T regolatorie, grazie alla loro attività immunomodulatoria, possono avere attività protettiva ^[69-72].

Una molteplicità di studi clinici ha messo in evidenza che i soggetti con infezione da HIV presentano un rischio cardiovascolare più elevato rispetto alla popolazione generale e che ciò è valido sia per i soggetti che assumono cART che per coloro che non assumono antiretrovirali. Ipertensione arteriosa, diabete, dislipidemia e abitudine tabagica sono generalmente più rappresentati nella popolazione HIV positiva, ma l'aumento del rischio cardiovascolare osservato sembra manifestarsi indipendentemente da tali fattori di rischio. Le cause sottostanti questa evidenza sono ancora oggi oggetto di studio. I principali meccanismi patogenetici proposti sono: le condizioni di immunoattivazione sistemica e di ipercoagulabilità, la disfunzione e il danno endoteliale e la dislipidemia che si osservano in corso di infezione da HIV ^[73].

La progressione delle placche aterosclerotiche è generalmente più rapida negli individui con infezione da HIV. I soggetti HIV positivi mostrano più elevati livelli di proteina C reattiva a elevata sensibilità (hsCRP) rispetto ai controlli HIV negativi, indipendentemente dalla cART e dalla soppressione della replicazione virale. La concentrazione di hsCRP nella popolazione HIV è direttamente correlata al rischio di infarto acuto del miocardio. Si ricorda brevemente che l'infiammazione cronica nell'organismo con infezione da HIV è sostenuta dalla replicazione virale residua a livello dei santuari immunologici, da componenti virali che presentano attività proinfiammatoria diretta, dalla traslocazione nel torrente circolatorio di prodotti di derivazione microbica di derivazione intestinale, dalla riattivazione di patogeni latenti quali i virus erpetici e dalla disfunzione dei meccanismi omeostatici immunomodulatori. Un'altra caratteristica di comune osservazione nella

popolazione HIV positiva è la disfunzione endoteliale, testimoniata dal riscontro di elevate concentrazioni di molecole quali VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3 e sulle cui concentrazioni non si osserva un effetto in senso riduttivo da parte della cART. Il frequente riscontro di placche morbide non calcifiche a disposizione circonferenziale che è proprio del soggetto con infezione da HIV sembrerebbe derivare da un'alterazione del metabolismo lipidico. La colesterolemia totale e la concentrazione di lipoproteine HDL sono ridotte durante le fasi iniziali dell'infezione. La riduzione della conta dei linfociti T CD4 è stata associata a un progressivo incremento delle lipoproteine LDL, dovuto a ridotto catabolismo, e a una riduzione di HDL e apolipoproteina B per via di un alterato metabolismo lipidico intracellulare a livello macrofagico. L'utilizzo dei farmaci antiretrovirali può contribuire allo sviluppo dell'aterosclerosi coronarica nei pazienti HIV positivi [74-80]. I dati derivati dallo studio D: A:D (Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs) condotto su 23437 pazienti con infezione da HIV, ha evidenziato un incremento del rischio di infarto del miocardio nei soggetti che assumevano cART pari a 1.16 per ogni anno di esposizione ai farmaci; il rischio più elevato è stato riscontrato tra i pazienti in terapia con PI. Questa classe di farmaci sarebbe in grado di aumentare l'espressione del recettore CD36 (un recettore spazzino), favorendo così l'accumulo di colesterolo nei monociti e la loro trasformazione in cellule schiumose. Inoltre, i PI sono stati associati alla presenza di elevati livelli di fibrinogeno e di Plasminogen Activator Inhibitor-1 [81]. L'utilizzo degli NRTI, della stavudina in particolare, è associato all'insorgenza di ipertrigliceridemia, insulino-resistenza e lipodistrofia. Più di recente, i dati derivanti dalla coorte D: A:D hanno messo in luce come l'assunzione di abacavir possa rappresentare un fattore di rischio indipendente per infarto miocardico, specialmente nei soggetti con preesistenti

fattori di rischio cardiovascolare. Studi condotti successivamente hanno mostrato risultati non univoci ^[82]. A sostegno dell'ipotesi dello studio D: A:D sembrerebbero essere i risultati dello studio SMART (Strategies for Management of Antiretroviral Therapy) che hanno suggerito che l'uso di abacavir potrebbe essere associato a un rialzo dell'infiammazione sistemica. In contrasto appaiono invece i risultati dello studio MACS (Multicenter AIDS Cohort Study) e dello studio HEAT (HIV study with Epzicom And Truvada) che hanno dimostrato una riduzione degli indici di infiammazione sistemica in seguito all'uso della cART senza differenze significative tra i regimi contenenti e quelli non contenenti abacavir. Alcuni dati di letteratura dimostrano un incremento dell'attivazione piastrinica ad opera del carbovir trifosfato, un metabolita dell'abacavir. Le più recenti indicazioni della Food and Drug Administration non hanno comunque posto limitazione alla prescrizione del farmaco vista la non disponibilità di dati univoci e conclusivi ^[83-85].

Gli score per il calcolo del rischio cardiovascolare costituiscono uno strumento di fondamentale importanza e utilità clinica. Si tratta infatti di equazioni applicabili a ciascun paziente per la valutazione del rischio individuale; tra le formule più utilizzate ritroviamo quella del Framingham Heart Study, quella dell'Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk Score (ASCVD) e quella del Systematic Coronary Risk Evaluation (SCORE). Questi strumenti sono stati elaborati con il fine essere applicati alla popolazione generale; il loro utilizzo per la valutazione dei soggetti con infezione da HIV non fornisce in tutti i casi una stima accurata del rischio in quanto i soggetti con infezione da HIV presentano alcuni fattori di rischio specifici che concorrono allo sviluppo della malattia ateromatosa. Attraverso i dati raccolti dallo studio D:A:D è stato elaborato un algoritmo per il calcolo del rischio cardiovascolare che tiene conto di variabili specifiche relative

all'infezione da HIV quali: conta dei linfociti T CD4+, esposizione ad abacavir, anni di esposizione ai PI e anni di esposizione agli NRTI. In diverse occasioni, questo algoritmo si è dimostrato maggiormente accurato rispetto agli score ideati per la popolazione generale [85-89].

Il Neutrophils to Lymphocytes Ratio (NLR) ed il Platelets to Lymphocytes Ratio (PLR) sono considerati indicatori di infiammazione subclinica e sono di facile ottenimento in quanto derivati da informazioni ematochimiche di base. Il NLR ha dimostrato una valenza prognostica negativa in soggetti HIV- e HIV+ affetti da neoplasie solide, inoltre si è dimostrato un valido fattore prognostico negativo nei soggetti HIV negativi affetti da scompenso cardiaco grave, da malattia coronarica stabile e in coloro i quali sono stati sottoposti a rivascolarizzazione coronarica percutanea. Il valore di PLR è stato valutato nella popolazione HIV negativa come indice prognostico infausto in pazienti affetti da neoplasia solida e in soggetti sottoposti a procedure di rivascolarizzazione coronarica. I dati disponibili in letteratura relativamente all'utilizzo di questi indici in popolazioni di pazienti con infezione da HIV sono scarsi; sulla base delle evidenze pubblicate, si potrebbe postulare che un rialzo del valore di questi indicatori potrebbe associarsi a una peggiore prognosi [90-94].

Tra gli indicatori radiologici del danno aterosclerotico, di grande utilità clinica risulta essere la misurazione dello spessore mio-intimale carotideo (IMT). Questo rappresenta un indicatore del danno aterosclerotico subclinico e, nella popolazione generale, appare predittivo di futuri eventi cardiovascolari. Nell'ambito della popolazione HIV+ questo parametro ha fornito evidenze non sempre univoche, infatti in diverse casistiche il valore di IMT è risultato maggiore nei soggetti con infezione da HIV rispetto agli individui senza infezione, mentre in altre occasioni

tale incremento è apparso essere associato esclusivamente a particolari condizioni, come ad esempio l'esposizione a IP [95-101].

L'avvento di metodiche non invasive di tomografia computerizzata (TC) e risonanza magnetica (RM) per lo studio delle coronarie ha permesso di identificare precocemente le formazioni aterosclerotiche nei pazienti con infezione da HIV. Per molti anni la visualizzazione e lo studio dell'albero coronarico è stato possibile solamente attraverso l'uso di metodiche invasive come la coronarografia. A dispetto dell'invasività, questa tipologia di indagini è caratterizzata da una elevata risoluzione spaziale (0.2-0.25 mm) e temporale (0.33 msec) grazie all'utilizzo di apparecchi fluoroscopici convenzionali. Attraverso la coronarografia tradizionale è possibile visualizzare vasi del diametro di 2-4 mm nonostante i movimenti generati dall'attività cardiaca e dagli atti del respiro; la dose radiante somministrata durante un singolo esame coronarografico è di circa 2.3-22.7 millisievert [102-104]. Negli ultimi anni, sempre maggiore interesse è stato rivolto verso l'utilizzo di tecniche di imaging coronarico non invasivo. Per un soddisfacente utilizzo della TC coronarica è necessario superare il problema legato al movimento dei tessuti dovuto al ciclo cardiaco e agli atti respiratori. Il problema dei movimenti respiratori è di facile soluzione attraverso l'uso di una breve pausa respiratoria volontaria. Affinché le immagini non vengano inficiate da artefatti di movimento legati all'azione cardiaca, le scansioni TC vengono registrate durante i periodi quiescenti del ciclo cardiaco e cioè durante la meso-diastole (66-330 msec) e la proto-sistole (0-223 msec). La loro durata è influenzata dalla frequenza cardiaca e a questo proposito può risultare utile l'uso di betabloccanti al fine di ridurre la frequenza cardiaca a 60-70 battiti per minuto; i betabloccanti inoltre riducono le variazioni del ritmo legate all'apnea respiratoria migliorando in questo modo la qualità delle immagini ottenute. I

moderni apparecchi TC e la tecnologia della doppia sorgente radiante permettono di ridurre i tempi di scansione fino a 75 msec, rendendo così sempre meno necessario il ricorso ai farmaci per il controllo del ritmo. La dose di radiazioni somministrata per ogni esame è di 4-14 millisievert e grazie agli apparecchi multidetettori è possibile completare la scansione dell'intero volume cardiaco in 1-2 secondi. L'angio-TC delle coronarie può essere applicata allo studio delle stenosi vasali, ma anche all'approfondimento della fisiopatologia dell'aterosclerosi, ad esempio attraverso la valutazione del calcio presente nelle placche ateromasiche mediante il calcolo dello score di Agatston. La calcificazione dell'albero coronarico correla direttamente con il rischio di infarto acuto del miocardio [105-109].

Recentemente, una popolazione mista composta da un totale di 759 individui sia HIV positivi che HIV negativi, provenienti dalla coorte MACS, è stata sottoposta ad angio-TC delle coronarie; i risultati di questo studio hanno evidenziato che i soggetti con infezione da HIV presentavano una maggiore prevalenza di aterosclerosi coronarica subclinica, indipendentemente dai classici fattori di rischio cardiovascolare. Allo stesso modo, gli individui con infezione da HIV mostravano una maggiore prevalenza di lesioni non calcifiche [110,111].

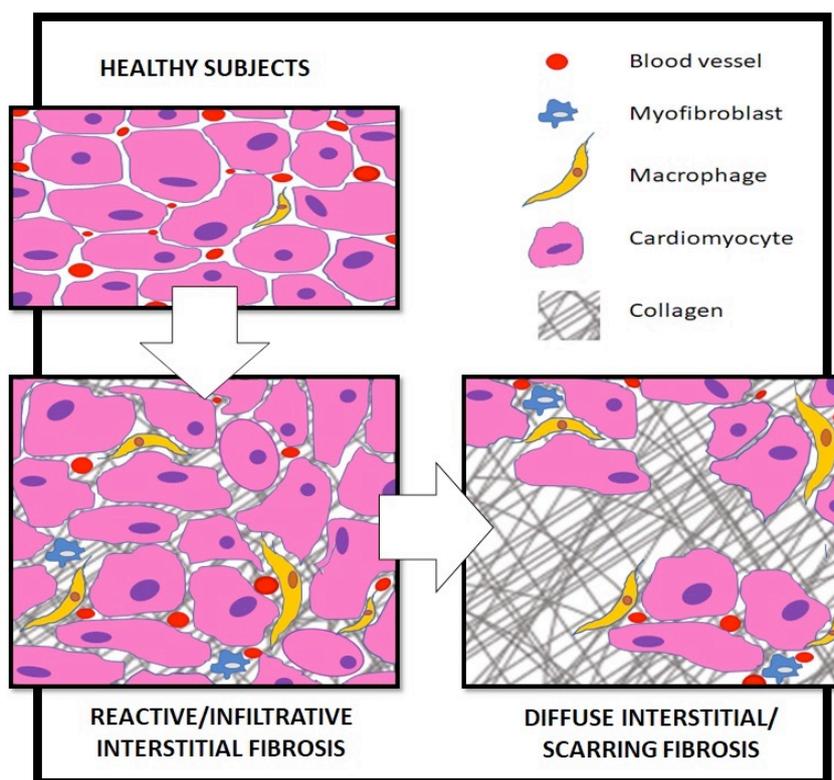
MATRICE CARDIACA EXTRACELLULARE E FIBROSI MIOCARDICA

La matrice cardiaca extracellulare (Cardiac Extracellular Matrix, ECM) è costituita da un'ampia varietà di proteine, con funzione strutturale e non-strutturale, e rappresenta il mezzo nel quale si trovano immersi i miocardiociti, le cellule vascolari, i fibroblasti e i leucociti; la ECM svolge un ruolo di fondamentale importanza nei processi di omeostasi miocardica, oltre a conferire a questo tessuto le caratteristiche di elasticità, resistenza e plasticità. I glicosaminoglicani sono

componenti fondamentali della matrice extracellulare in tutti i diversi tessuti dell'organismo umano; vengono suddivisi in 4 gruppi principali sulla base della struttura della componente disaccaridica centrale: condroitin solfati/dermatan solfati, eparin solfati/eparan solfati, keratan solfati, ialuronato (anche noto con il nome di acido ialuronico). Ciascuno di questi gruppi svolge funzioni distinte all'interno della biologia della ECM. In generale, i glicosaminoglicani partecipano ai processi di sviluppo e maturazione del tessuto miocardico, ma sono anche implicati in processi patologici quali ad esempio la degenerazione miocardica para-fisiologica dell'invecchiamento e le valvulopatie cardiache. Tra i glicosaminoglicani, l'acido ialuronico rappresenta quello di maggiore peso molecolare all'interno della ECM, oltre ad essere l'unico non associato a una struttura proteica. La produzione di acido ialuronico risulta essere incrementata in condizioni patologiche quali ad esempio l'infarto del miocardio, le miocarditi e la cardiomiopatia ipertrofica. Gli oligosaccaridi derivati da questa molecola, che sono maggiormente presenti in condizioni di stress, svolgono funzioni profondamente diverse rispetto ai progenitori di maggiore peso molecolare e risultano avere attività proinfiammatoria e fibrogenica. I proteoglicani della ECM sono suddivisi in diversi sottogruppi sulla base del loro peso molecolare, della localizzazione extracellulare e della loro funzione: ialectani (versicano, aggrecano, neurocano e brevicano), proteoglicani della membrana basale (perlecano, collagene di tipo XVIII e agrina), proteoglicani della superficie cellulare (sindecani e glipicano) e proteoglicani ricchi in leucina di piccole dimensioni (biglicano, decorina, lumicano e osteoglicina). Tra questi, gli ialectani e i proteoglicani della superficie cellulare rappresentano quelli meglio caratterizzati. In particolare, all'interno di questi due sottogruppi, il versicano e i sindecani svolgono importanti ruoli nei processi fisio-patologici della

ECM, attraverso la modulazione dell'interazione tra le componenti cellulari del miocardio e molecole quali fattori di crescita e i loro recettori o la modulazione dell'esposizione cellulare agli stimoli pro-infiammatori. Un ruolo di rilievo nei processi di risposta al danno miocardico è svolto dai proteoglicani ricchi in leucina di piccole dimensioni, mentre meno noto è il ruolo svolto dai proteoglicani della membrana basale nei processi miocardici. Insieme alle componenti già descritte, anche le glicoproteine, anch'esse suddivise in diversi sottogruppi sulla base delle caratteristiche strutturali, prendono parte alla modulazione dei processi legati ai vari momenti del rimodellamento miocardico ^[112,113].

La presenza di alterazioni della normale composizione della ECM rappresenta una spia della perdita dei processi di omeostasi miocardica e potrebbe in ultima analisi indicare la presenza di una condizione patologica. La perdita dell'equilibrio tra i processi di sintesi e degradazione delle componenti della ECM conduce verso una condizione di fibrosi miocardica. L'espansione della ECM è stata collegata ad alterazioni della conduzione elettrica intra-cardiaca, a disfunzioni di natura meccanica e a disfunzioni di natura vasomotoria, a fibrosi miocardica e in ultima analisi a un incrementato rischio di mortalità per causa cardiaca. Le caratteristiche e la distribuzione della fibrosi miocardica differiscono in base al differente stato patologico sottostante lo stato di fibrosi. Questa infatti potrà mostrare una distribuzione localizzata o una distribuzione diffusa.



In linea generale, la fibrosi miocardica viene classificata in: 1) fibrosi da sostituzione; 2) fibrosi interstiziale.

La fibrosi da sostituzione si viene a determinare per via dei normali processi riparativi che si attivano in seguito a un insulto al tessuto miocardico con danno della parete cellulare dei miocardiociti ed eventuale necrosi; questo tipo di fibrosi mostra più frequentemente una distribuzione localizzata, ma si può anche presentare con una diffusione generalizzata a seconda della causa sottostante. La causa più frequente di questo tipo di fibrosi è rappresentata dall'infarto miocardico, ma può anche essere causate da patologie quali la cardiomiopatia ipertrofica, la sarcoidosi, la miocardiopatia dell'insufficienza renale cronica o le cardiomiopatie su base tossica. Al contrario, la fibrosi miocardica interstiziale si presenta generalmente con una distribuzione diffusa e può essa stessa essere suddivisa in due differenti sottogruppi: la fibrosi reattiva e la fibrosi interstiziale da infiltrazione. La fibrosi

reattiva è dovuta all'accumulo di fibre collagene nello spazio interstiziale ad opera dei miofibroblasti attivati e si osserva ad esempio nel corso dei normali processi di invecchiamento o nella cardiopatia ipertensiva. La fibrosi infiltrativa, condizione decisamente meno frequente, è invece caratterizzata dalla deposizione nello spazio interstiziale di proteine insolubili e/o glicosfingolipidi; questo tipo di degenerazione fibrotica si osserva in caso di patologie quali l'amiliodosi miocardica o la malattia di Anderson-Fabry. Entrambe queste forme di fibrosi interstiziale sono caratterizzate da necrosi dei miocardiociti e sostituzione con tessuto fibroso [114,115].

MISURAZIONE RADIOLOGICA DELLA FIBROSI MIOCARDICA

La fibrosi miocardica rappresenta la manifestazione finale della maggioranza delle patologie che coinvolgono il muscolo cardiaco. Ad oggi non sono disponibili marcatori sierici affidabili per l'identificazione della fibrosi miocardica, pertanto sino all'avvento delle moderne metodiche radiologiche l'identificazione e la quantificazione della fibrosi in generale e della fibrosi miocardica in particolare è stato un esclusivo appannaggio dell'anatomopatologo attraverso la misurazione della matrice extracellulare sulle sezioni istologiche dopo specifica colorazione per il tessuto connettivo. Al contrario, oggigiorno si osserva un sempre maggiore utilizzo di metodiche radiologiche non invasive per la diagnosi e quantificazione della fibrosi miocardica condotta attraverso la valutazione del Volume Extra Cellulare (ECV). Per essere in grado di valutare il ECV, la sequenza radiologica, sia essa di Risonanza Magnetica (MR) o di Tomografia Computerizzata (TC), richiede l'utilizzo di un mezzo di contrasto a distribuzione extracellulare. Sia i mezzi di contrasto iodati utilizzati per gli esami TC, che quelli a base di gadolinio comunemente utilizzati per gli esami di RM, presentano alcune fondamentali

caratteristiche che li rendono ottimi candidati per la valutazione del ECV: 1) si distribuiscono in maniera omogenea all'interno di uno stesso tessuto; 2) presentano elevata idrofilia e ridotta liposolubilità; 3) non vengono assorbiti; 4) sono stabili dal punto di vista biochimico e vengono progressivamente e interamente eliminati dall'organismo; 5) sono facilmente misurabili. Dopo infusione in bolo, sia i mezzi di contrasto iodati che quelli a base di gadolinio diffondono dal sangue all'interno del tessuto miocardico secondo un gradiente di concentrazione crescente (fase di wash-in), per poi andare incontro a un progressivo ritorno nel sangue secondo un gradiente di concentrazione inverso (fase di wash-out). In condizioni di normalità, questo processo di diffusione inizia nell'arco di secondi per poi concludersi nell'arco di alcuni minuti; in caso di fibrosi miocardica, questo processo richiede un tempo maggiore per giungere a completamento, in quanto l'ingresso e la fuoriuscita del mezzo di contrasto dal tessuto risultano complicati dall'alterazione della circolazione coronarica locale, dall'alterata distribuzione e permeabilità dei capillari intra-miocardici e da un aumentato accumulo tissutale del mezzo di contrasto in ragione della maggiore presenza di acqua extracellulare nel tessuto fibroso. Come conseguenza di queste alterazioni, in caso di fibrosi del tessuto miocardico, in fase tardiva si riscontrerà una maggiore concentrazione di mezzo di contrasto nel muscolo cardiaco fibrotico rispetto al sangue ^[116-119].

La prima tecnica radiologica ad essere utilizzata per lo studio del ECV miocardico è stata la RM. Nonostante siano disponibili una maggiore esperienza e una maggiore quantità di dati riguardo questa metodica rispetto alla TC, l'utilizzo della tomografia computerizzata ai fini della valutazione del ECV miocardico mostra diversi vantaggi: 1) il mezzo di contrasto iodato utilizzato per effettuare la TC permette una valutazione diretta dell'effetto del liquido di contrasto sul segnale misurato, mentre

la RM permette esclusivamente una valutazione indiretta attraverso la misurazione dell'effetto del mezzo di contrasto a base di gadolinio sui protoni del tessuto miocardico, dando quindi per assunto che il tempo di rilassamento del tessuto miocardico e del sangue siano sovrapponibili; 2) la TC offre una risoluzione spaziale maggiore rispetto alla RM; 3) i mezzi di contrasto a base di gadolinio sono associati al rischio di fibrosi sistemica nefrogenica (specialmente nei soggetti con eGFR <30 ml/min/1.73 m²); 4) la TC risulta di più semplice e rapida esecuzione rispetto alla RM, non risentendo tra l'altro di alcune delle controindicazioni della RM come ad esempio la presenza di materiale ferro-magnetico o pace-maker o la claustrofobia; 5) i macchinari per l'esecuzione di RM, in quanto maggiormente costosi, non sono diffusi e accessibili quanto le strumentazioni per l'effettuazione di TC. Di contro, la TC presenta alcuni svantaggi rispetto alla RM: 1) esposizione a radiazioni ionizzanti; 2) il mezzo di contrasto iodato espone il paziente al rischio di nefropatia da mezzo di contrasto, specialmente in pazienti con compromissione renale pre-esistente (eGFR <60 ml/min/1.73 m²); 3) maggiore suscettibilità alla presenza di artefatti; 4) nelle sequenze tardive, il mezzo di contrasto iodato fornisce un segnale più debole rispetto ai mezzi di contrasto a base di gadolinio rendendo così difficile la differenziazione tra muscolo e cavità cardiaca. Entrambi i tipi di mezzo di contrasto espongono il paziente al rischio di danno. Nonostante i rispettivi vantaggi e i rispettivi limiti, entrambe le metodiche si sono dimostrate affidabili in studi di confronto condotti rispetto al gold standard, rappresentato dall'istologia, pertanto la scelta della metodica dovrebbe basarsi sulle singole caratteristiche del paziente e sulle possibilità e risorse della singola struttura sanitaria [120,121].

PARTE II

PREMESSA E OBIETTIVI DELLO STUDIO

È ormai noto che l'aterosclerosi rappresenta una patologia degenerativa dei vasi arteriosi di grande e medio calibro che riconosce l'infiammazione come principale meccanismo fisiopatologico. Allo stesso modo, la patogenesi dell'infezione da HIV è legata all'incremento dello stato infiammatorio dell'organismo e al conseguente esaurimento della funzione delle cellule del sistema immunitario. I soggetti con infezione da HIV presentano uno stato di immunoattivazione sistemica e un'incidenza di patologie infiammatorio-degenerative più elevate rispetto alla popolazione sana. Considerato quanto appena descritto, non stupisce che la malattia cardiovascolare rappresenti una delle principali cause di morte tra le persone con infezione da HIV (15% dei decessi degli individui HIV+ negli Stati Uniti). Il rischio di infarto acuto del miocardio è raddoppiato nel soggetto con infezione da HIV in trattamento ART rispetto ai soggetti HIV- di uguale età e sesso. Inoltre, l'età media di esordio della malattia coronarica acuta è inferiore nel soggetto HIV+ rispetto a quella del soggetto HIV-, infatti l'età media di insorgenza è di 48 anni nella popolazione maschile con infezione da HIV, a fronte di un'età media di insorgenza di 55-65 anni nei maschi HIV-. Oltre ai tradizionali fattori di rischio cardiovascolare (età, sesso, ipertensione arteriosa, dislipidemia, diabete mellito, fumo di sigaretta), l'infezione da HIV, le co-infezioni, l'incrementata immunoattivazione e la terapia ARV, svolgono un ruolo nell'insorgenza della malattia coronarica. L'utilizzo della TC con mezzo di contrasto applicata allo studio dell'albero coronarico, fornisce un mezzo non invasivo, di semplice e rapida applicazione, in grado di valutare la presenza, la conformazione e la composizione (grado di calcificazione della placca)

di eventuali ateromi indolenti. L'utilizzo combinato delle sequenze pre- e post-contrastografiche offre inoltre la possibilità di valutare l'entità della fibrosi miocardica attraverso la misurazione del ECV.

In considerazione di ciò, le finalità del presente studio sono state di:

- Valutare la prevalenza di malattia coronarica subclinica in una popolazione di soggetti HIV+ senza fattori di rischio cardiovascolare.
- Valutare l'entità della malattia coronarica in tale popolazione.
- Individuare i fattori associati alla presenza di malattia coronarica subclinica nei soggetti studiati.
- Valutare lo stato di fibrosi miocardica e la sua associazione con la malattia coronarica.

MATERIALI E METODI

Popolazione dello studio

Il presente studio ha preso in considerazione una popolazione di 55 soggetti con infezione da HIV in follow-up presso l'Ambulatorio di Malattie Infettive del Policlinico Umberto I Università di Roma "Sapienza".

I criteri di esclusione dallo studio sono stati i seguenti:

- Rischio >10% di presentare un evento cardiovascolare a 10 anni, stimato mediante algoritmo di Framingham.
- Presenza di sindrome metabolica, secondo i criteri ATP III (concomitanza di almeno 3 fra i seguenti criteri: obesità addominale, ipertensione arteriosa, iperglicemia a digiuno, ipertrigliceridemia, ipocolesterolemia HDL).
- Anomalie evidenziate allo screening con ECG da sforzo.
- Anomalie evidenziate allo screening con ecocardiogramma.

- Presenza di coinfezione con HCV.

Parametri biometrici, clinici e biochimici

Di ciascun partecipante sono stati registrati i principali parametri biometrici di interesse (età, sesso, BMI e circonferenza addominale), la pressione arteriosa, la colesterolemia totale, la colesterolemia LDL, la colesterolemia HDL e la trigliceridemia. Il rischio di eventi cardiovascolari maggiori è stato valutato per ogni paziente utilizzando l'equazione di Framingham, l'equazione ASCVD e il D:A:D cardiovascular risk estimator. Inoltre, di ogni partecipante sono stati registrati i parametri immuno-virologici attuali e pregressi (conta dei linfociti T CD4+ e HIV RNA plasmatico). È stata infine valutata la concentrazione sierica di hsCRP di tutti i soggetti arruolati (<1 mg/L: basso rischio cardiovascolare; 1 - 3 mg/L: rischio cardiovascolare intermedio; >3 mg/L: rischio cardiovascolare elevato).

Esami strumentali

Tutti i pazienti arruolati sono stati sottoposti a un'indagine ecografica per la valutazione dello spessore mio-intimale carotideo bilaterale (IMT). La misurazione di IMT è stata effettuata valutando la parete posteriore dell'arteria carotide comune, campionando la misura ad 1 cm dalla biforcazione carotidea.

Tutti i partecipanti sono inoltre stati sottoposti a un esame TC con mezzo di contrasto per studio dell'albero coronarico; lo studio TC è stato condotto secondo un protocollo di acquisizione prospettica ECG-triggered a basso dosaggio radiante. Gli esami sono stati effettuati utilizzando un rivelatore dual-source multidetettore a 64 strati (collimazione 32x2x0.6; spessore delle sezioni ottenute 1.2 mm; rotazione del gantry 320 msec; voltaggio 120 kV; tube current time production 160 mAs;

finestra di acquisizione pari al 70% dell'intervallo R-R; ricostruzione delle sezioni pari a 3 mm con B20 kernel; macchinario Somatom Siemens, Germania), i dati acquisiti sono stati analizzati utilizzando una workstation dedicata (Vitrea 2.6, USA). Per la valutazione dell'albero coronarico è stata adottata la segmentazione proposta dall'American Heart Association, prendendo in considerazione tutti i segmenti di calibro all'origine ≥ 1 mm. La gravità della stenosi coronarica è stata classificata secondo lo schema qui di seguito riportato:

- Stenosi grado 1: 30-49%
- Stenosi grado 2: 50-69%
- Stenosi grado 3: 70-99%
- Stenosi grado 4: 100%

In accordo con le attuali linee guida, sono state considerate significative tutte le stenosi di grado ≥ 2 .

La composizione di ciascuna placca ateromasica è stata valutata attraverso la misurazione della sua radiodensità secondo la scala Hounsfield (HU):

- Placca non calcifica: 0 - 30 HU
- Placca fibro-calcifica: 31 – 220 HU
- Placca calcifica: ≥ 221 HU

L'esecuzione di una seconda TC coronarica di follow-up è stata pianificata a distanza di 5 anni dalla prima per la valutazione dell'evoluzione del quadro ateromasico.

Il Calcium Score dei partecipanti è stato calcolato mediante l'equazione di Agatston.

Il rischio cardiovascolare stimato in base al Calcium Score di Agatston è stato stratificato secondo il seguente schema:

- Assenza di malattia coronarica: 0

- Rischio cardiovascolare minimo: 1-10
- Rischio cardiovascolare lieve: 11-100
- Rischio cardiovascolare moderato: 101-400
- Rischio cardiovascolare elevato: >400

La misurazione del ECV è stata condotta mediante misurazione della radiodensità (scala Hounsfield) in immagini tratte da sequenze pre- e post-contrastografiche. Le regioni di interesse (Regions of Interest, ROIs) sono state tracciate in corrispondenza del setto interventricolare e in corrispondenza della camera cardiaca del ventricolo sinistro, dapprima su immagini raccolte in fase di equilibrio e poi riportate in immagini raccolte in fase post-contrasto (area media delle ROIs è stata di 3 cm², range 1.5-5 cm²). L'attenuazione media del segnale tra le ROIs è stata valutata in unità HU e la frazione di ECV miocardico è stata calcolata mediante la seguente equazione:

$$ECV (\%) = \lambda \cdot (1-H) \cdot 100\%$$

dove λ indica il coefficiente di ripartizione del mezzo di contrasto (ovvero il rapporto tra l'attenuazione osservata a livello sanguigno e a livello miocardico) e H indica il valore di ematocrito. La variazione di attenuazione (ΔHU) è stata calcolata come $\Delta HU = HU_{post} - HU_{pre}$, dove HU_{post} identifica l'attenuazione osservata dopo la somministrazione del mezzo di contrasto iodato, mentre HU_{pre} rappresenta l'attenuazione osservata prima della somministrazione di mezzo di contrasto.

Il valore di ECV è stato misurato, oltre che nei soggetti HIV positivi arruolati, anche in una popolazione composta da 20 soggetti sani HIV negativi, di età e sesso sovrapponibile alla popolazione HIV positiva dello studio.

Altri parametri

Tra i parametri considerati vi sono stati anche le abitudini di vita dei partecipanti, la familiarità per malattia cardiovascolare e la familiarità per eventi cardiovascolari precoci, la storia clinica e terapeutica relative all'infezione da HIV (anni di esposizione ad HIV, anni di esposizione agli antiretrovirali, terapia ARV attuale e pregressa). Sono stati inoltre valutati il rapporto tra conta piastrinica e conta dei linfociti circolanti (Platelets to Lymphocytes Ratio, PLR) e il rapporto tra conta dei neutrofili e conta dei linfociti su sangue periferico (Neutrophils to Lymphocytes ratio, NLR). Per la variabile PLR, sulla base di quanto riportato in letteratura, sono stati considerati normali i valori compresi tra 100 e 200, sono invece stati considerati alterati i valori <100 o >200 . Sempre in base a quanto indicato dalla letteratura è stato scelto un cut-off di normalità per il valore NLR pari a 1.2.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata condotta mediante il software SPSS versione 24 (release 24.0 64-bit edition, International Business Machines Corp.).

La verifica della normalità di distribuzione dei dati analizzati è stata condotta mediante test di Shapiro-Wilk. Le variabili continue a distribuzione parametrica sono state descritte come mediana e valore minimo-massimo; nel caso di variabili continue a distribuzione non parametrica è stata utilizzata la media \pm deviazione standard. Le variabili dicotomiche sono state descritte mediante proporzioni, frequenze assolute o rapporto in riferimento al totale.

L'analisi univariata è stata condotta, nel caso di dati con distribuzione parametrica, attraverso il t-test di Student. Per l'analisi univariata dei dati con distribuzione di tipo non parametrico è stato utilizzato, nel caso di variabili dipendenti, il test di Wilcoxon,

mentre nel caso di variabili dipendenti è stato applicato il test di Mann-Whitney. Per lo studio delle correlazioni tra le variabili sono stati applicati il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman. Infine, sono state condotte analisi multivariate attraverso l'applicazione di un modello di regressione logistica lineare.

RISULTATI

Caratteristiche della popolazione studiata

Nel presente studio sono stati arruolati 55 soggetti con infezione da HIV in follow-up presso l'Ambulatorio del Dipartimento di Malattie Infettive del Policlinico Umberto I Università di Roma "Sapienza". Di questi, 46 individui erano di sesso maschile (83.6%) e 9 individui di sesso femminile (16.4%); l'età media di tutti i partecipanti è stata di 47.6 ± 8.7 anni, l'età media dei partecipanti di sesso maschile è stata di 47 ± 9.2 anni, quella dei soggetti di sesso femminile è stata pari a 46 ± 5.2 anni. In questo studio non sono stati inclusi pazienti affetti da diabete mellito, pazienti affetti da ipertensione arteriosa o soggetti con coinfezione HIV/HCV. Il valore mediano di BMI riscontrato è stato di 22 kg/m^2 (range: 17-29). Una familiarità per eventi cardiovascolari tra i consanguinei di I grado è stata riscontrata in 8 pazienti (14.5%), nessuno dei partecipanti presentava invece anamnesi personale di pregressa malattia cardiovascolare.

In relazione all'infezione da HIV, il valore mediano del nadir dei CD4 nella popolazione studiata è stato di 181 cell/ μL (range: 17 - 480), il valore mediano di zenit HIV RNA plasmatico è stato di 128333 copie/ml (range: 359 – >500000). Il numero mediano di anni di esposizione ad HIV è stato di 10 anni (range: 1-23). Uno stadio A2 (secondo la classificazione CDC) alla diagnosi è stato evidenziato in 20 individui (36.4%), uno stadio CDC A3 in 10 individui (18.2%), uno stadio CDC B3

in 2 individui (3.7%), uno stadio CDC C2 in 3 individui (5.3%), uno stadio CDC C3 in 20 individui (36.4%). I pazienti che in anamnesi patologica presentavano una storia di infezione opportunistica sono stati 23 (41.8%), le patologie AIDS definenti riscontrate sono state: tubercolosi polmonare, criptosporidiosi, polmonite da *Pneumocystis jirovecii*, infezione sistemica da CMV, herpes zoster multimetamerico, nocardiosi polmonare, wasting syndrome, sarcoma di Kaposi. Al momento dell'inclusione nello studio, 49 pazienti stavano stabilmente assumendo un regime di terapia ART; il valore mediano della durata di assunzione degli antiretrovirali al momento dell'arruolamento è stato di 9 anni (range: 0-24); 38 pazienti stavano assumendo o avevano assunto in passato un regime terapeutico contenente un PI, il valore mediano della durata dell'esposizione ai PI è stato di 3 anni (range: 0-14); 23 pazienti stavano invece assumendo o avevano assunto in passato un regime terapeutico contenente un backbone composto da due NRTI di cui uno rappresentato da abacavir. Il valore mediano della durata dell'esposizione ad abacavir nella popolazione dello studio è stato di 0 anni (range 0-9).

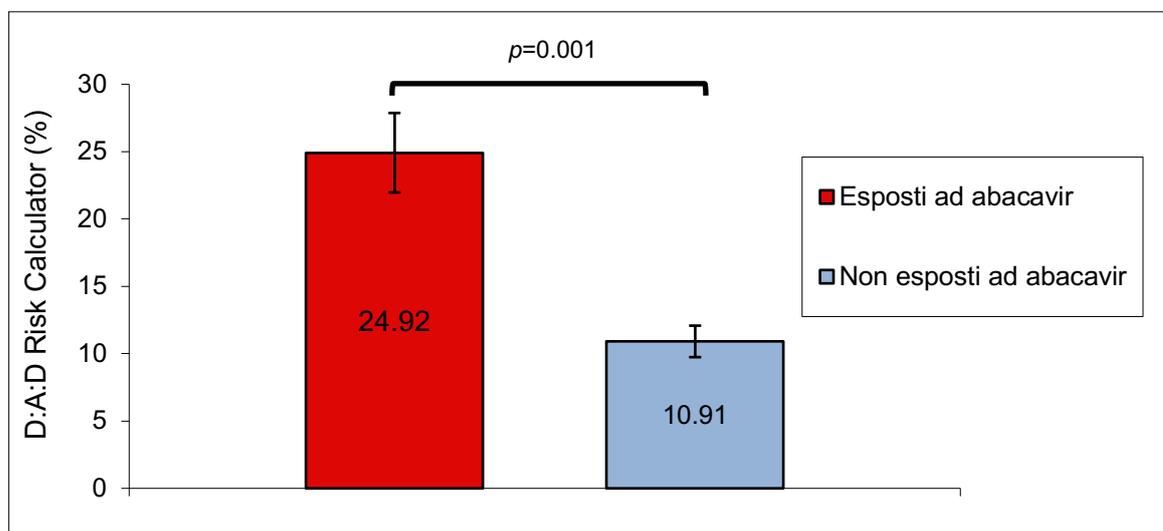
Un gruppo di 20 soggetti HIV negativi di età e sesso sovrapponibili ai soggetti HIV positivi è stato incluso nello studio per la valutazione e il confronto del ECV. Tra i due gruppi non sono state rilevate differenze in merito ai valori di BMI, colesterolemia totale, colesterolemia LDL, colesterolemia HDL, trigliceridemia, rischio cardiovascolare secondo algoritmo Framingham e rischio cardiovascolare secondo algoritmo ASCVD.

Score di rischio cardiovascolare

Tutti i pazienti arruolati presentavano un rischio di eventi cardiovascolari maggiori a 10 anni <10% secondo l'equazione di Framingham. Il valore mediano di rischio

stimato mediante algoritmo di Framingham riscontrato nella popolazione HIV positiva è stato pari a 3% (range: 1-9). Il valore di rischio Framingham mediano nella popolazione maschile è stato di 5% (range: 1-9), mentre il valore mediano riscontrato nella popolazione femminile è stato pari a 1% (range: 1-5). Il rischio cardiovascolare calcolato mediante l'equazione ASCVD (American College of Cardiology - American Heart Association) ha mostrato un valore mediano di rischio a 10 anni pari a 4.6% (range: 1-14.6). Il valore ASCVD mediano della popolazione maschile è stato 6.5% (range: 2.1-14.6), mentre il valore mediano osservato nella popolazione femminile è stato di 1.5% (range: 1-6.5). Un totale di 3 pazienti, tra i quali 2 maschi e 1 femmina, mostravano al momento dell'arruolamento un valore ASCVD di rischio a 10 anni >10%. Il rischio "lifetime" calcolato mediante l'equazione ASCVD ha mostrato un valore mediano nella popolazione pari a 36% (range: 5-50). Il rischio "lifetime" mediano nella popolazione maschile è risultato 36% (range: 5-50), mentre quello della popolazione femminile è stato di 39% (range: 5-39). Il valore mediano dello score D:A:D nella popolazione studiata è stato 15.2% (range: 0.8-57.2), con un valore mediano tra i soggetti di sesso maschile pari a 22% (range: 0.82-53.1) e un valore mediano tra i pazienti di sesso femminile pari a 15.2% (range: 3.7-57.2). La scala di Framingham e lo score ASCVD a 10 anni hanno mostrato un significativo grado di concordanza ($r=0.676$; $p<0.001$); un simile grado di concordanza è stato osservato tra score Framingham e D:A:D ($r=0.520$; $p<0.001$). I pazienti con stenosi coronarica $\geq 50\%$ hanno mostrato un più elevato punteggio medio in tutti gli score di rischio cardiovascolare considerati: Framingham (6.25% vs. 3.2%; $p=0.003$), ASCVD rischio a 10 anni (6.2% vs. 4%; $p=0.009$), ASCVD lifetime (43.25% vs. 36.8%; $p=0.024$) e D:A:D (23.2% vs. 14.1%; $p<0.001$). È stata rilevata una correlazione diretta tra il grado di rischio

cardiovascolare rilevato attraverso lo score Framingham e l'entità della stenosi coronarica ($r=0.381$; $p=0.004$); una correlazione diretta è stata osservata anche tra il rischio stratificato mediante l'algoritmo ASCVD a 10 anni e la stenosi coronarica ($r=0.342$; $p=0.019$) e tra lo score D:A:D e il grado di stenosi coronarica ($r=0.463$; $p<0.001$). I valori di Framingham sono risultati significativamente più elevati nei pazienti che presentavano un Agatston calcium score >100 (3.87% vs. 2.81%; $p=0.046$), mentre lo score D:A:D ha mostrato una correlazione diretta rispetto al valore di Agatston calcium score ($r=0.463$; $p<0.001$). Non sono state rilevate differenze nei valori di ASCVD a 10 anni tra i partecipanti con Agatston calcium score superiore o inferiore a 100. Infine, lo score D:A:D è risultato significativamente più elevato nei soggetti esposti ad abacavir (24.92% vs. 10.91%; $p=0.001$) e nei pazienti esposti a PI (20.87% vs. 7.61%; $p=0.001$).



Il 50° percentile di valore Framingham tra i soggetti con stenosi coronarica significativa è risultato essere pari a 7,5%.

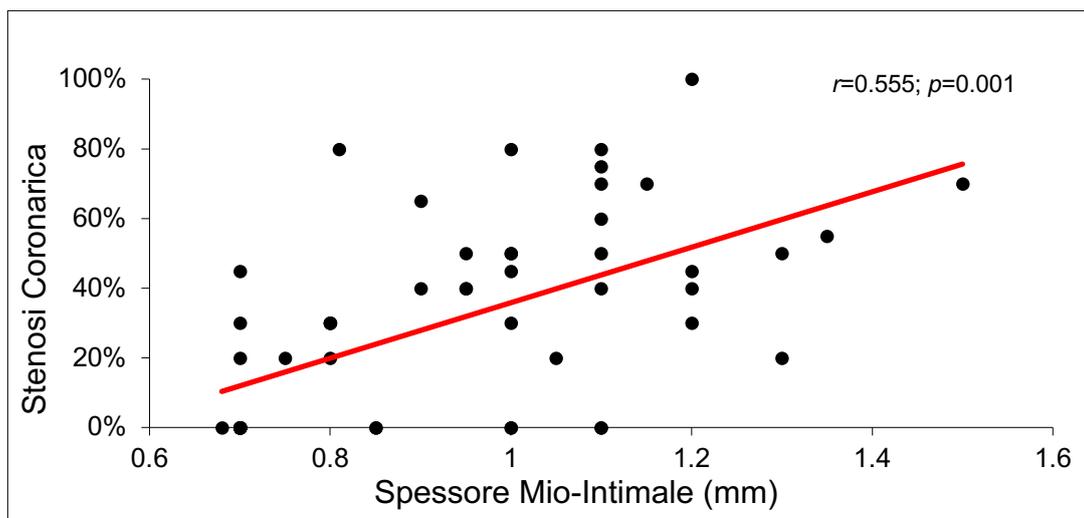
Platelets to Lymphocytes Ratio e Neutrophils to Lymphocytes Ratio

All'interno della popolazione del presente studio, 30 soggetti (55%) hanno mostrato un PLR entro limiti della norma (valore medio 127.8 ± 4.7) e 25 soggetti (45%) hanno presentato invece un valore <100 (valore medio 82.3 ± 2.3). L'età dei soggetti con PLR <100 è risultata essere sovrapponibile, sebbene al limite della significatività statistica, rispetto chi presentava PLR ≥ 100 (50.8 ± 7.8 vs. 45.6 ± 6.7 anni; $p=0.056$). Nei soggetti con PLR <100 è stato osservato un significativo incremento dei valori di spessore mio-intimale carotideo (1.01 ± 0.05 mm vs. 0.85 ± 0.03 mm; $p=0.012$). Inoltre, un valore PLR al di fuori del range di normalità è risultato essere associato al riscontro di un più elevato valore di score D:A:D ($21.88 \pm 3.2\%$ vs. $14.42 \pm 2\%$; $p=0.057$) e di un più elevato valore Framingham ($3.3 \pm 0.5\%$ vs. $5 \pm 0.6\%$; $p=0.045$). Il grado di stenosi coronarica tra i soggetti con PLR <100 e ≥ 100 è risultato sovrapponibile ($34.7 \pm 6.5\%$ vs. $23.1 \pm 5\%$; $p=0.161$). Ad ogni modo, una stenosi coronarica di grado significativo è stata riscontrata nel 33% dei soggetti con PLR <100 , mentre solamente il 19% dei soggetti che presentavano un PLR >100 ha mostrato una stenosi coronarica significativa.

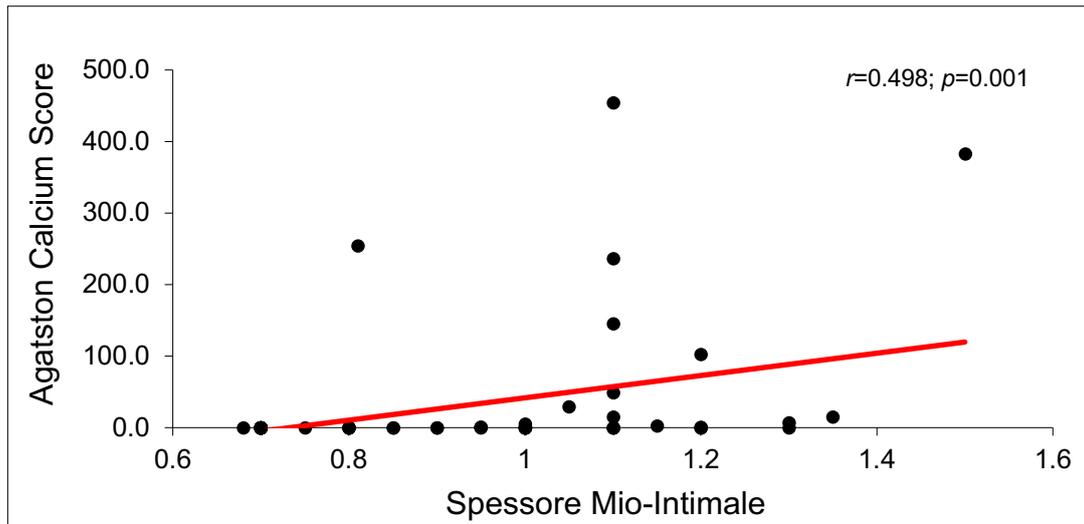
Nella popolazione studiata, 39 pazienti (71%) mostravano un NLR >1.2 . È stata riscontrata una tendenza a presentare un più elevato valore medio dello score Framingham nei soggetti che presentavano un NLR >1.2 rispetto a coloro che presentavano un valore di NLR <1.2 (1.87% , range 1.12-3.45, vs. 1.31% , range 0.84-2.61; $p=0.067$); non sono state riscontrate altre differenze rilevanti in funzione del cut-off di NLR considerato.

Spessore mio-intimale carotideo

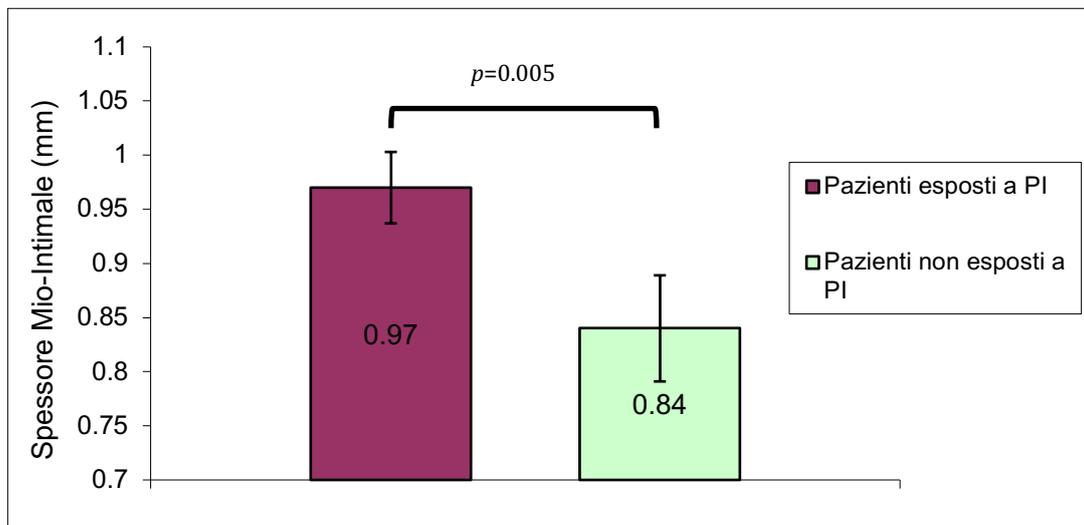
La misurazione dello spessore mio-intimale carotideo (IMT), misurato a livello della parete posteriore dell'arteria, ha mostrato un valore mediano nella popolazione studiata di 0.95 mm (range: 0.7 – 1.5). Il valore mediano di IMT riscontrato tra i soggetti di sesso maschile è stato di 0.95 mm (range: 0.8-1.5), mentre il valore mediano riscontrato nella popolazione femminile è stato di 0.90 mm (range: 0.7-1.2; $p=0,4$). I pazienti con stenosi coronariche di grado ≥ 2 hanno mostrato valori di IMT significativamente superiori in confronto ai soggetti con stenosi di grado 0 - 1 (1.1 ± 0.04 vs. 0.8 ± 0.03 mm; $p<0,001$). Il valore di IMT e l'entità della stenosi coronarica si sono dimostrati essere direttamente correlati ($r=0.555$; $p=0.001$).



Il valore di IMT ha mostrato correlazione diretta anche nei confronti dell'Agatston calcium score ($r=0.498$; $p=0.001$).



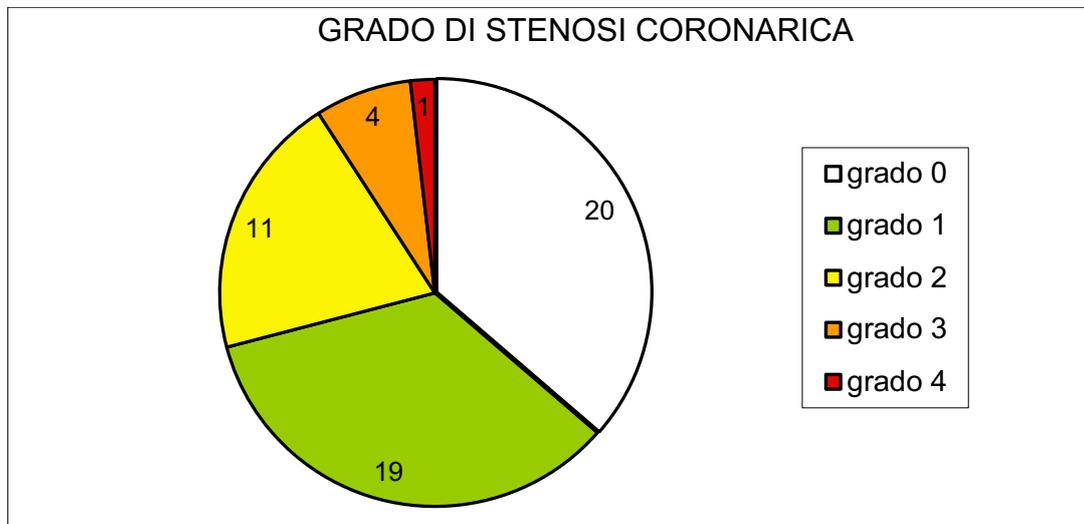
L'esposizione ai PI è risultata essere associata a un maggiore grado di ispessimento mio-intimale carotideo (0.97 ± 0.03 mm vs. 0.84 ± 0.05 mm; $p=0.005$)



Non è invece stata osservata un'influenza dell'assunzione di abacavir sul valore di ispessimento mio-intimale carotideo.

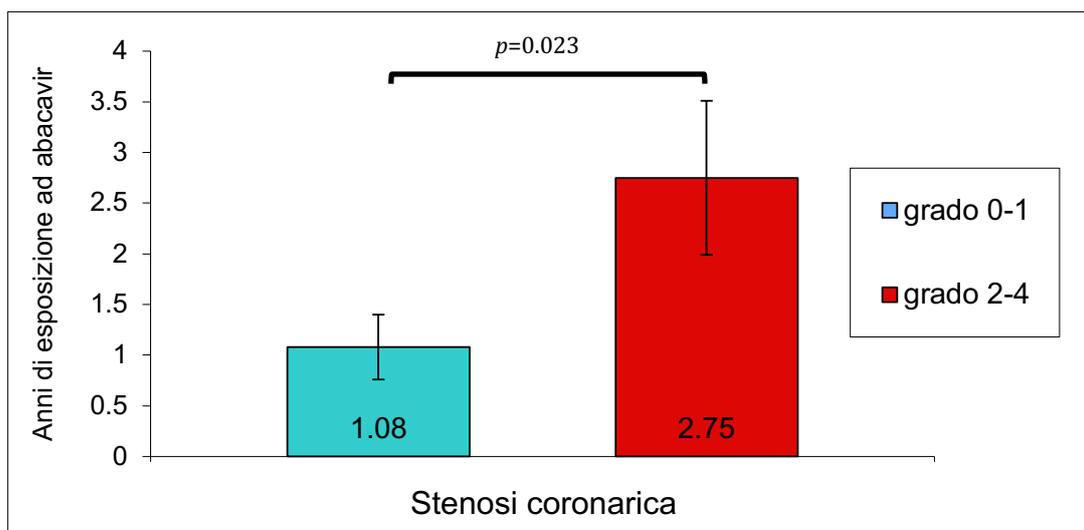
Ateromasia dell'albero coronarico

Tutti i soggetti arruolati nello studio sono stati sottoposti a TC con mezzo di contrasto per indagare la pervietà delle arterie coronarie. La maggioranza dei partecipanti (35 pazienti, 63.6%) presentava almeno una placca ateromastica di qualunque grado. Di questi, 16 pazienti (45.7%) mostravano almeno una placca coronarica di grado significativo ($\geq 50\%$ del lume) mentre 19 pazienti (54.3%) presentavano almeno una stenosi vasale ma di entità non significativa ($< 50\%$ del lume). Tra i pazienti con stenosi significativa, in 11 casi (68.7%) si è trattato di una stenosi di grado 2 (50-69% del lume), in 4 casi (25%) di una stenosi di grado 3 (70-99% del lume) e in 1 caso (6.3%) si è trattato di una stenosi del 100% del lume arterioso (grado 4).



Un interessamento monovasale è stato riscontrato in 20 tra i soggetti portatori di stenosi coronarica di qualunque entità (57.2%), in 11 partecipanti è stato riscontrato un interessamento di due rami coronarici (31.4%), mentre un interessamento di tre segmenti è stato riscontrato in 4 individui (11.4%). La presenza di placche coronariche multiple è stata osservata con maggiore frequenza tra i pazienti portatori

di almeno una stenosi di grado significativo (87.5% vs. 47%; $p=0.026$). Anche la lunghezza dei tratti stenotici è risultata significativamente maggiore nei soggetti con interessamento di grado ≥ 2 (16.6 mm vs. 4.3 mm; $p=0.001$). L'età dei pazienti che presentavano almeno 1 stenosi coronarica $\geq 50\%$ del lume vasale è risultata significativamente più elevata rispetto a coloro i quali presentavano stenosi di grado 0-1 (54 ± 7.5 anni vs. 44.8 ± 7.8 anni; $p=0.002$). Non è stata osservata un'associazione tra gli anni totali di terapia antiretrovirale e la presenza di stenosi di grado ≥ 2 , è stata invece rilevata una maggiore durata di esposizione ad abacavir tra i soggetti portatori di almeno 1 stenosi di grado significativo (2.75 ± 0.76 anni vs. 1.08 ± 0.32 anni; $p=0.023$).



I soggetti esposti ad abacavir nella popolazione dello studio presentavano un'età simile rispetto ai non esposti (50.1 ± 8.1 anni vs. 45.9 ± 8.9 anni; $p=0.133$), di contro l'esposizione alla TARV è risultata essere maggiore negli esposti ad abacavir (11.3 ± 4.6 anni vs. 6.5 ± 5.2 anni; $p=0.019$). Nei soggetti esposti ad abacavir è stato rilevato un valore mediano di stenosi coronarica pari a 47% (range: 0-80), mentre nei partecipanti che non hanno mai assunto questo farmaco il valore mediano

riscontrato è stato del 20% (range: 0-100) ($p=0.005$). Dei 23 pazienti esposti ad abacavir, 19 hanno mostrato la presenza di stenosi coronariche di qualunque grado (82.6%), mentre una stenosi significativa è stata riscontrata in 10 di questi pazienti (43.5% dei pazienti esposti al farmaco; 52.6% di tutte le stenosi riscontrate tra gli individui esposti). Dei 32 pazienti che non hanno mai assunto abacavir, in 16 casi è stata osservata la presenza di stenosi di qualunque grado (50%), mentre una stenosi significativa è stata riscontrata in 6 individui (18.7% dei non esposti al farmaco, 37.5% delle stenosi riscontrate nel gruppo dei non esposti).

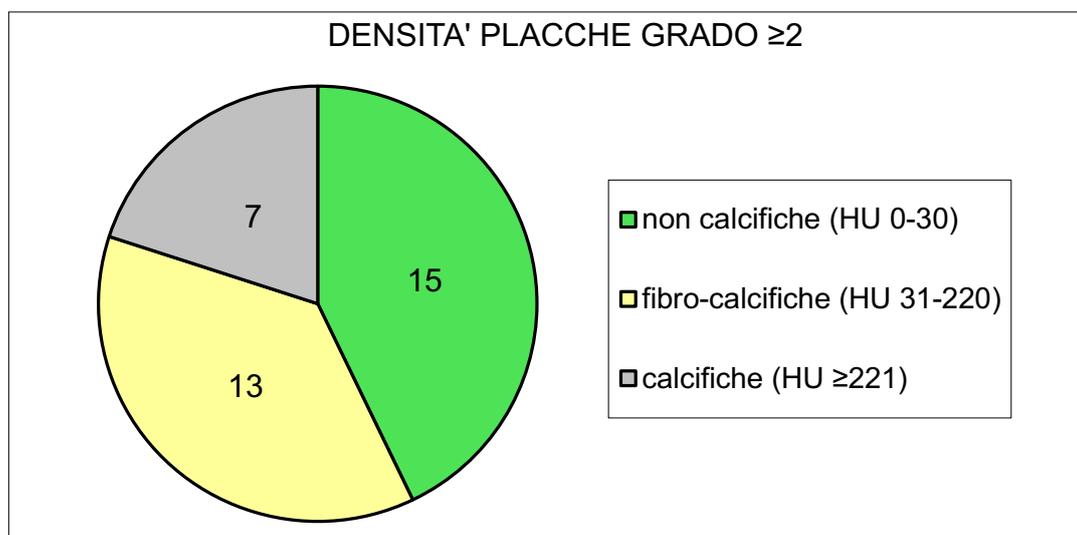
Nella popolazione studiata, il valore del nadir dei linfociti T CD4+ e il valore dello zenit di HIV RNA dei pazienti con stenosi coronariche significative, sono risultati simili a quelli degli individui che presentavano stenosi non significative o che non presentavano alcuna stenosi. Anche il BMI è apparso sovrapponibile tra questi gruppi di pazienti. Lo score Framingham e lo score ASCVD non hanno mostrato differenze tra il gruppo degli esposti e quello dei non esposti ad abacavir (rispettivamente $p=0.948$ e $p=0.102$).

Applicando il modello di regressione lineare multivariata è stato possibile identificare l'età, la conta delle cellule T CD4, lo spessore mio-intimale carotideo e i tre score di rischio cardiovascolare come fattori predittivi la presenza di stenosi coronariche >50%.

PRESENZA DI STENOSI >50%	Univariata p-value	Multivariata	
		F-value	p-value
Età	0.003	5.854	0.020
CD4 nadir	0.630	0.971	0.971
CD4	0.08	4.467	0.040
Anni di infezione	0.090	2.638	0.111

Anni TARV	0.324	0.634	0.430
Anni PI	0.258	0.058	0.811
Anni ABC	0.043	1.320	0.257
Framingham	0.002	8.880	0.005
ASCVD	0.034	4.498	0.039
D:A:D	0.015	3.423	0.071
IMT	<0.001	14.716	<0.001
ECV	0.334	0.228	0.635

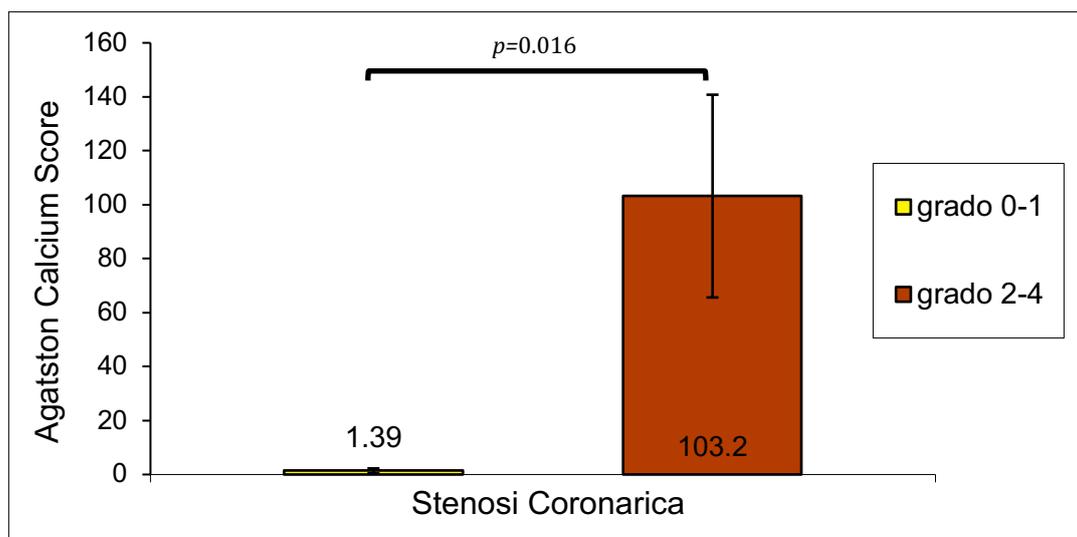
Di tutte le placche ateromatiche riscontrate (grado 1-4), il 52.9% è risultato essere non calcifico, nel 35.3% dei casi si è trattato di placche a composizione fibro-calcifica e nel 11.8% dei casi si è trattato di lesioni con prevalente composizione calcifica.



Tra le placche di grado ≥ 2 è stata invece riscontrata una percentuale di placche non calcifiche pari a 43.8% mentre le percentuali di placche a composizione mista e di quelle calcifiche sono state rispettivamente di 37.4% e 18.8%.

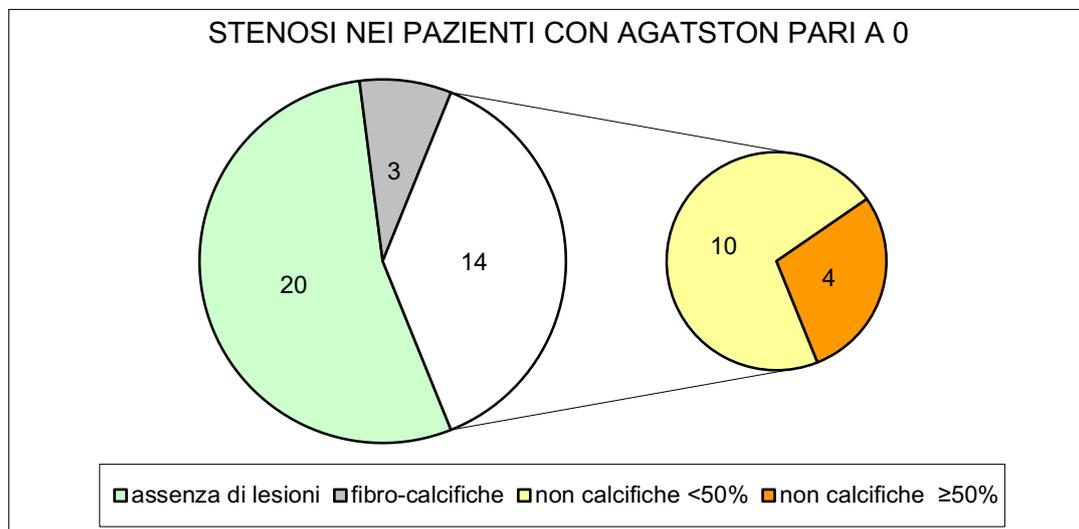
Agatston calcium score

La determinazione del rischio cardiovascolare attraverso la quantificazione del calcio coronarico ha mostrato la presenza di un rischio minimo in 8 partecipanti (14.5%), la presenza di un rischio lieve in 4 pazienti (7.3%), la presenza di un rischio moderato in 5 soggetti (9.1%) e la presenza di un rischio elevato in 1 paziente (1.8%); i restanti partecipanti hanno mostrato un Agatston calcium score pari a 0. È stata osservata una correlazione tra il valore di Agatston ed il grado di stenosi coronarica ($r=0.539$; $p=0.001$). Inoltre, il valore di Agatston calcium score è risultato significativamente più elevato nei soggetti con una stenosi di grado ≥ 2 (103.20 ± 37.57 vs. 1.39 ± 0.87 ; $p=0.016$).



Su un totale di 37 pazienti con Agatston score pari a 0, l'esame TC delle coronarie ha mostrato la presenza di placche ateromasiche non calcifiche in 14 soggetti (38%) e la presenza di placche a composizione fibro-calcifica in 3 individui (8%). Tra questi casi di ateromasia non calcifica, in 4 individui (28.6%) si è trattato di ostruzioni coronariche significative (stenosi del 50% in 1 caso, stenosi del 65% in 1

caso, stenosi del 80% in 2 casi). Non sono state osservate lesioni ateromatose fibro-calcifiche di entità significativa tra i soggetti con Agatston calcium score pari a 0.



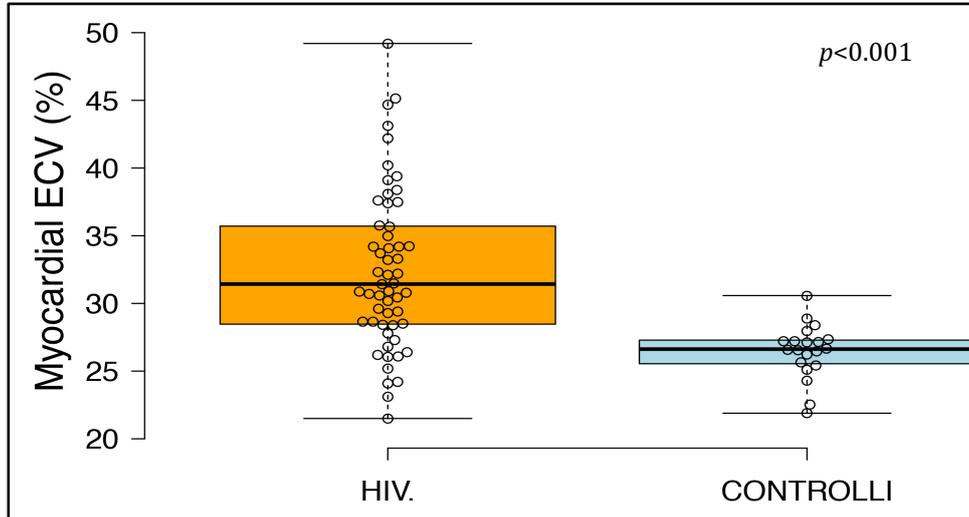
Proteina C Reattiva a elevata sensibilità

Nella popolazione oggetto di questo studio è stata osservata una correlazione diretta tra il valore di hsCRP e il grado di ostruzione coronarica ($r=0.292$; $p=0.038$), tuttavia non è stata osservata una differenza statisticamente significativa nei valori di hsCRP tra i soggetti con e quelli esenti da stenosi di grado ≥ 2 (1.29 vs. 0.92; $p=0.177$). Inoltre, in 12 individui stratificati a rischio intermedio in base al valore di hsCRP non sono state rilevate stenosi coronariche di grado significativo.

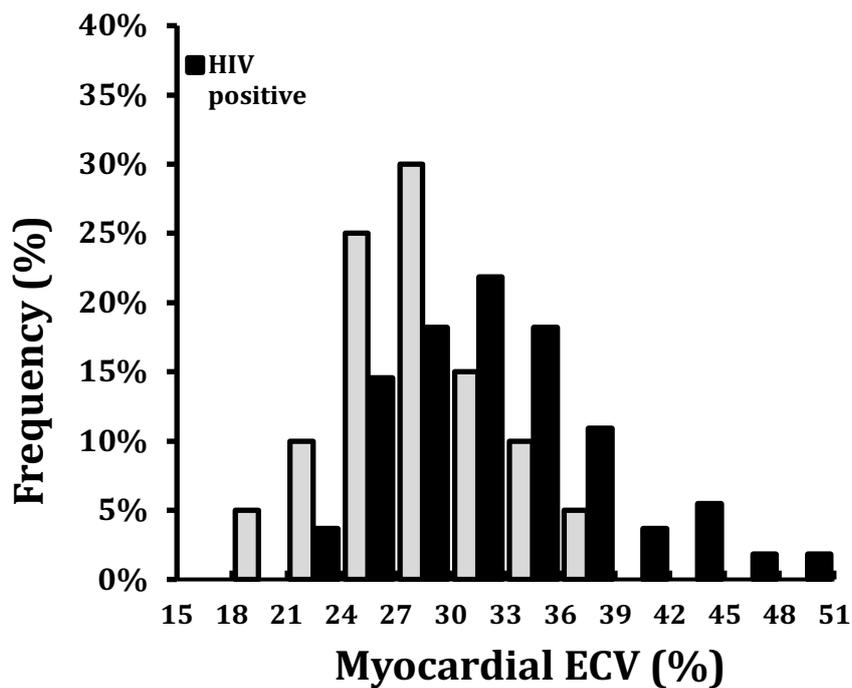
Volume extracellulare

Il valore di ematocrito, necessario per la valutazione del ECV, è risultato essere $35\pm 4\%$ nei soggetti HIV positivi e $40\pm 3\%$ nella popolazione di controllo. I valori di BMI, colesterolemia totale, colesterolemia LDL, colesterolemia HDL, trigliceridemia, rischio cardiovascolare secondo algoritmo Framingham e rischio cardiovascolare secondo algoritmo ASCVD sono risultati sovrapponibili tra le due

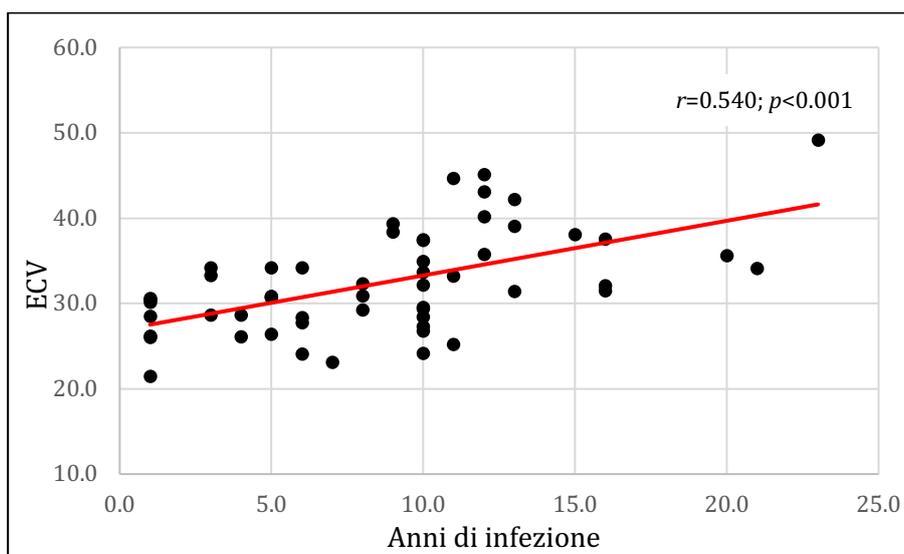
popolazioni. Il valore medio di ECV nel gruppo di controllo è risultato pari a $27 \pm 2.3\%$ mentre il valore medio osservato nei partecipanti HIV positivi è risultato essere significativamente più elevato, ovvero $32 \pm 6.1\%$ ($p < 0.001$).



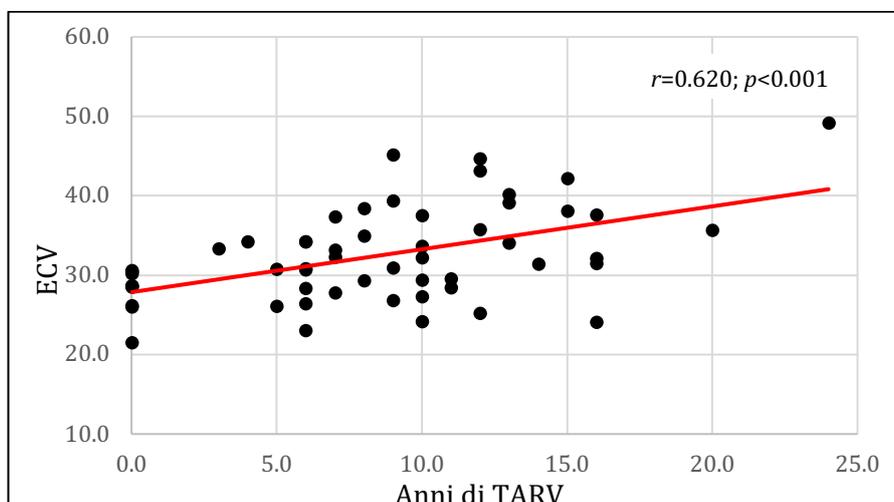
La distribuzione del valore di ECV nei soggetti HIV positivi e nei controlli si sono dimostrate simile, sebbene, come già evidenziato, i soggetti con infezione da HIV abbiano mostrato in media valori superiori.



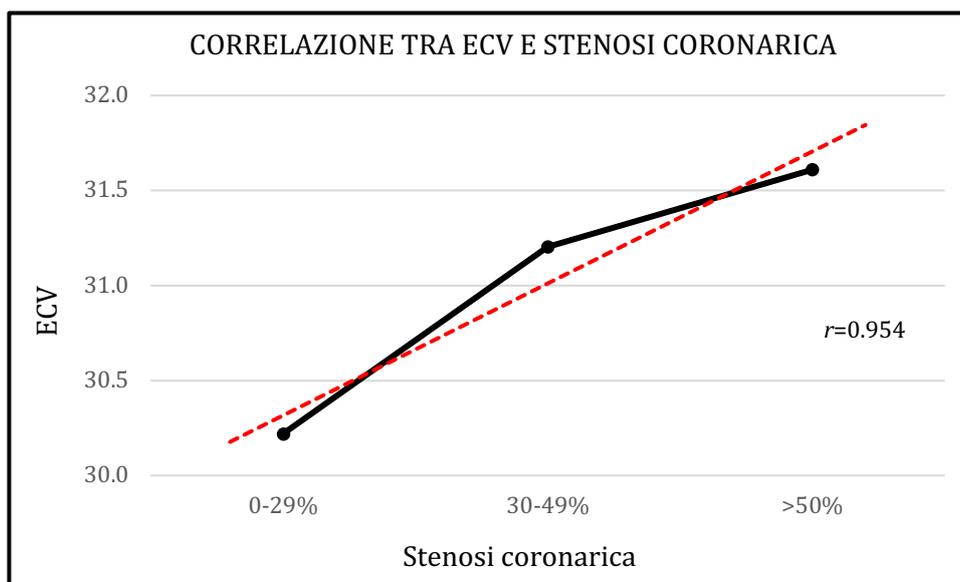
Il valore ECV riscontrato nella popolazione di controllo si è dimostrato in linea rispetto a quanto riportato letteratura scientifica (valori nel soggetto sano pari a 25-26%). L'espansione del ECV nella popolazione HIV positiva è risultato essere correlato con gli anni di esposizione ad HIV ($r=0.540$; $p<0.001$).



ECV è anche risultato correlato con la durata dell'esposizione ai farmaci antiretrovirali ($r=0.620$; $p<0.001$).



Stratificando il valore di ECV dei partecipanti sulla base dell'entità della stenosi coronarica (stenosi 0-29%, stenosi 30-49%, stenosi 50-100%) è stata evidenziata una correlazione tra il valore di ECV e il restringimento dell'albero coronarico.



La regressione lineare multivariata ha mostrato come il numero di anni di infezione, ma non l'età né il quantitativo di anni di esposizione ai farmaci antiretrovirali, costituiscono fattori di rischio indipendenti per un incremento del ECV.

ECV PATOLOGICO	Univariata	Multivariata	
	p-value	F-value	p-value
Età	0.517	0.270	0.606
CD4 nadir	0.251	0.998	0.324
CD4	0.949	0.040	0.843
Anni di infezione	0.003	5.158	0.029
Anni TARV	0.017	2.691	0.109
Anni PI	0.182	0.337	0.565
Anni ABC	0.760	1.009	0.321

Framingham	0.970	0.244	0.624
ASCVD	0.861	0.110	0.742
D:A:D	0.402	0.000	0.989
Stenosi coronarica	0.239	0.637	0.430
IMT	0.215	1.815	0.186

Follow-up

Durante il follow-up, 16 pazienti con stenosi coronariche significative sono stati sottoposti ad una coronarografia invasiva ed in 11 casi si è ritenuto necessario il posizionamento di almeno 1 stent arterioso. Sono stati applicati in totale 19 stents. Dei pazienti sottoposti a posizionamento di stents coronarici, 9 stavano assumendo o avevano assunto in passato abacavir. Applicando il modello di regressione logistica multivariata è stato possibile determinare un lieve incremento del rischio di andare incontro a posizionamento di stent coronarico nei soggetti esposti ad abacavir (odd ratio 1.37; 95% CI: 1.01-1.86).

Ad oggi, 11 partecipanti sono stati sottoposti a un secondo esame TC con mezzo di contrasto a distanza di 5 anni dalla prima scansione. Non sono state osservate differenze rilevanti tra i valori registrati al basale ed i valori registrati al follow-up in relazione allo score Framingham, ASCVD a 10 anni, ASCVD lifetime, NLR e IMT. Degli 11 soggetti sottoposti ad un secondo esame TC delle coronarie, i 6 pazienti che non mostravano stenosi al T₀ non hanno mostrato comparsa di lesioni al T₁; in 1 caso non si è osservata progressione al T₁ di una lesione ateromatosa non calcifica significativa già presente al T₀; in 1 paziente si è osservata la comparsa di una stenosi non significativa e la progressione di una stenosi significativa già presente al T₀ (ostruzione del 50% al T₀ e ostruzione del 60% al T₁), la stenosi era dovuta in entrambi i casi a placche non calcifiche; in 3 pazienti si è osservata la

comparsa di lesioni ateromatose non calcifiche, significative (grado 2) in 2 casi e non significativa (grado 1) in 1 caso. I 3 soggetti che hanno mostrato la comparsa di nuove lesioni coronariche al T₁ erano stati esposti ad abacavir, tra questi 1 paziente ha continuato ad assumere abacavir durante gli anni di follow-up mentre negli altri 2 abacavir è stato sospeso nel corso del follow-up. Dei 6 pazienti esenti da stenosi al T₁, in un singolo caso si è osservata un'anamnesi positiva per storia di esposizione ad abacavir. Nessuno dei pazienti rivalutati al T₁ presentava abitudine tabagica attiva o pregressa.

CONCLUSIONI

È oramai noto che l'aterosclerosi coronarica riconosce un'eziologia infiammatoria e che l'attività svolta da una molteplicità di cellule del sistema immunitario e di mediatori solubili pro-infiammatori partecipano al processo di formazione ed evoluzione della placca ateromasica. Allo stesso modo, il fulcro della patologia conseguente all'infezione da HIV si ritrova proprio nell'incremento dello stato di immuno-attivazione sistemica. La disponibilità dei farmaci antiretrovirali e l'espansione dell'accesso alla terapia hanno reso possibile un significativo miglioramento della qualità e un incremento dell'aspettativa di vita dei pazienti con infezione da HIV, tanto che ad oggi i soggetti HIV⁺ presentano una sopravvivenza sovrapponibile a quella degli individui HIV⁻. Ciò nonostante, i soggetti con infezione da HIV vanno incontro a un accelerato processo di senescenza e a una precoce insorgenza delle problematiche proprie della fisiopatologia dell'invecchiamento, proprio a causa dell'aumentata immuno-attivazione sistemica. Tra le patologie non-AIDS correlate, l'aterosclerosi delle arterie coronarie e l'infarto acuto del miocardio rivestono sicuramente un ruolo d'indiscutibile rilievo, causando

circa il 15% dei decessi tra la popolazione HIV+ del Nord America. L'utilizzo di metodiche non invasive, alternative alla coronarografia, per la valutazione dello stato di aterosclerosi coronarica si sta progressivamente espandendo. A questo proposito, l'utilizzo dell'angio-TC coronarica con mezzo di contrasto sta andando incontro a un sempre maggiore utilizzo, infatti le più recenti linee guida di consenso emanate dalle principali società americane di Cardiologia e di Radiologia suggeriscono l'uso di questa metodica anche per la valutazione di pazienti cardiologicamente stabili nei quali non vi sia evidenza di malattia cardiovascolare. Nel corso del presente studio sono stati indagati, attraverso l'uso dell'angio-TC coronarica, la presenza, l'entità e la qualità delle placche aterosclerotiche coronariche in una popolazione di soggetti con infezione da HIV di giovane età, con basso score di rischio cardiovascolare secondo Framingham e ASCVD e con un normale reperto all'esame ECG da sforzo. A tale proposito, nella nostra casistica è stata riscontrata un'elevata prevalenza di stenosi coronariche di entità significativa (come riportato in letteratura scientifica è stato scelto un cut-off pari a $\geq 50\%$ del lume arterioso per identificare le stenosi di grado significativo), nonostante la popolazione in studio fosse composta da pazienti "insospettabili". A questo riguardo, risulta degno di nota il caso di un individuo che presentava una stenosi completa della coronaria destra, verosimilmente venutasi a formare gradualmente in ragione dell'evidenza di circoli collaterali compensatori. Per di più, in una cospicua percentuale dei partecipanti (44%) è stato riscontrato un interessamento coronarico multi-vasale. Come prevedibile, l'età avanzata è risultata essere associata alla presenza di stenosi coronariche di maggiore severità. Allo stesso modo, il quantitativo di anni di esposizione ad HIV è risultato essere maggiore nei soggetti con stenosi di grado significativo; questo dato si presta a una duplice lettura: gli anni di esposizione ad

HIV sono espressione dell'esposizione a livelli di infiammazione mediamente più elevata rispetto alla norma, i livelli di hsCRP infatti sono risultati correlati al grado di stenosi coronarica; d'altro canto, l'incremento del numero di anni di infezione corrisponde anche all'incremento dell'età del soggetto.

L'introduzione dei farmaci antiretrovirali nella pratica clinica ha radicalmente trasformato il panorama dell'infezione da HIV, riducendone drasticamente la mortalità e abbattendo l'incidenza delle complicanze AIDS correlate. Di contro, queste molecole sono gravate da una potenziale tossicità metabolica e il loro utilizzo è stato associato a un incremento del rischio cardiovascolare. L'utilizzo dei farmaci inibitori delle proteasi di HIV è gravato da un cospicuo rischio di alterazioni del metabolismo lipidico e ipercolesterolemia, tali farmaci sono stati associati ad un incremento del valore di IMT nei pazienti HIV+. I dati derivati dalla popolazione oggetto del nostro studio confermano tale associazione, infatti è stato riscontrato un maggiore valore di IMT nei pazienti esposti ai PI rispetto a coloro che non sono stati esposti a questa classe di farmaci.

Nel 2008 è emersa dall'analisi dei dati della coorte D:A:D un'associazione tra l'assunzione di abacavir e un incremento dell'incidenza di infarto acuto del miocardio; tale associazione è stata confermata nei successivi update provenienti dai dati della medesima coorte. I dati pubblicati in merito a tale argomento non sono però univoci e allo stato attuale non è possibile stabilire con assoluta certezza la fondatezza di tale associazione ed escludere quindi il ruolo di eventuali fattori confondenti (ad esempio channeling bias). Nella presente casistica, i pazienti portatori di almeno 1 stenosi coronarica significativa hanno mostrato una prolungata esposizione, attuale o pregressa, ad abacavir rispetto ai soggetti con stenosi non significative e a coloro i quali non presentavano alcuna stenosi coronarica. Lo score

Framingham e lo score ASCVD, che nella popolazione studiata hanno dimostrato di essere in grado di identificare un rischio maggiore nei soggetti con stenosi coronarica >50%, hanno invece fornito risultati sovrapponibili tra il gruppo degli esposti ad abacavir e i non esposti. Al contrario, non sorprende che lo score D:A:D abbia fornito risultati significativamente più elevati nei soggetti esposti a questo farmaco, questo algoritmo infatti tiene in considerazione proprio l'esposizione agli antiretrovirali e in particolare ad abacavir. Se teniamo in considerazione il fatto che in letteratura è riportato che lo score Framingham tende a sottostimare il rischio cardiovascolare nei soggetti HIV+, e se consideriamo che nella nostra popolazione è stato possibile determinare un odd ratio pari a 1.37 di andare incontro a posizionamento di stent coronarico nei soggetti esposti a questo farmaco, sebbene il calcolo del D:A:D score richieda un tempo maggiore rispetto al Framingham o allo score ASCVD, sulla base di tali evidenze si ritiene utile integrare la stratificazione del rischio cardiovascolare nei soggetti HIV positivi con l'applicazione di questo algoritmo, almeno nei soggetti in terapia attuale o pregressa con abacavir.

Come sopra riportato, nel presente studio il Framingham e il D:A:D score sono risultati aumentati nei pazienti che presentavano stenosi coronariche significative. Lo score Framingham è apparso maggiormente correlato con la presenza di una stenosi >50% del lume coronarico rispetto all'algoritmo ASCVD ed è stato possibile determinare un odd ratio di presentare stenosi coronariche significative pari a 1.3 in relazione a incrementati valori di Framingham; in considerazione di ciò e del fatto che il valore mediano di Framingham registrato nei pazienti con stenosi significativa è stato di 7.5%, sebbene la numerosità del nostro campione sia limitata, i dati ottenuti potrebbero suggerire di adottare questo valore come soglia per l'identificazione di

un rischio cardiovascolare clinicamente rilevante nella popolazione HIV+, anziché il valore standard di 10%.

Il Platelets to Lymphocytes Ratio è considerato un marcatore di infiammazione, facile da ottenere in quanto derivato dai dati contenuti in un semplice esame emocromocitometrico. Nella popolazione generale, un PLR alterato è stato associato a una peggiore prognosi nei pazienti oncologici e nei soggetti sottoposti a rivascolarizzazione coronarica percutanea. Nella popolazione HIV+ il PLR è stato indagato prevalentemente in qualità di indicatore prognostico per la patologia neoplastica, sebbene uno studio in particolare, derivato dai dati della coorte MASTER, abbia messo in luce un aumento del rischio di mortalità da qualsiasi causa nei soggetti HIV+ con PLR <100 o >200 . Nel nostro studio non sono stati rilevati valori di PLR >200 pertanto i partecipanti sono stati stratificati in base a valori <100 o ≥ 100 . I dati del presente studio, per quanto limitati dalla ridotta dimensione del campione considerato, suggeriscono che il PLR potrebbe rappresentare un utile strumento di integrazione per la stratificazione del rischio cardiovascolare nei soggetti con infezione da HIV. Infatti, il riscontro di un aumentato spessore miointimale carotideo rappresenta un solido e comprovato fattore di rischio cardiovascolare nei pazienti HIV+; a questo proposito, nella popolazione studiata un valore di PLR >100 è risultato associato a un incremento del IMT carotideo, con valori medi osservati al di sopra della soglia patologica (valore medio osservato di 1.01 ± 0.05 mm con valore normale <0.9 mm). Il valore medio registrato tra i partecipanti con PLR ≥ 100 è risultato 0.85 ± 0.03 mm, ovvero nel range di normalità. Nella nostra popolazione, il valore di IMT è risultato significativamente maggiore nei pazienti con ostruzione coronarica di grado significativo; sebbene il grado di stenosi coronarica sia risultato sovrapponibile tra chi presentava un PLR <100 o

≥ 100 , nel primo gruppo la presenza di stenosi coronarica $> 50\%$ è stata riscontrata nel 33% dei casi, a fronte del 19% nel secondo gruppo. Inoltre, nel primo gruppo sono stati registrati più elevati valori di Framingham e D:A:D score. Un possibile fattore confondente potrebbe essere rappresentato dal fatto che, seppure l'età dei partecipanti con $PLR < 100$ sia risultata essere sovrapponibile a quella dei soggetti con $PLR \geq 100$, questi valori appaiono al limite della significatività statistica.

Il Neutrophils to Lymphocytes Ratio è stato applicato sia alla popolazione HIV- che a quella HIV+. Un rialzo di questo indice infiammatorio ha dimostrato una valenza prognostica sfavorevole in pazienti affetti da diversi tipi di neoplasie solide e, per quanto concerne la popolazione HIV-, in pazienti con malattia coronarica stabile o in pazienti sottoposti a procedure di rivascolarizzazione coronarica percutanea. Sebbene i dati di letteratura disponibili riguardo l'utilizzo di NLR come indice di outcome cardiovascolare nei pazienti con infezione da HIV siano scarsi e non conclusivi, i valori di NLR risultano generalmente superiori nei pazienti con infezione da HIV rispetto ai soggetti HIV- e il rischio di malattia cardiovascolare sembrerebbe essere aumentato nei soggetti HIV+ in presenza di un valore ≥ 1.2 . Altri studi, condotti su popolazioni di individui HIV- hanno preso in considerazione valori di cut-off pari a 2.05. Nella nostra casistica il valore di NLR ha mostrato un andamento opposto rispetto a quanto ci si sarebbe potuti aspettare, ovvero, si sono evidenziati valori di stenosi coronarica, calcium score, IMT, Framingham, ASCVD e D:A:D più elevati nei soggetti con valori di NLR ridotti. Il valore di NLR tra i pazienti con placche a bassa densità (fibrose non calcifiche, con ridotto rischio di andare incontro a rottura) è risultato inferiore rispetto ai soggetti con placche a elevata densità (calcifiche, con elevato rischio di rottura). Questi dati potrebbero suggerire che l'inaspettato andamento di NLR osservato potrebbero essere dovuti

alle caratteristiche della popolazione in oggetto, ovvero composta da individui senza apparenti fattori di rischio cardiovascolare.

La prevalenza di placche ateromasiche non calcifiche nella popolazione HIV+ è superiore se confrontata alla popolazione generale; in linea con questo dato di letteratura, nella nostra casistica è stata riscontrata un'elevata proporzione di placche "morbide". Ciò pone dubbi circa l'applicabilità del Calcium Score nei pazienti con infezione da HIV. Questo infatti, sebbene nella nostra casistica sia risultato correlato al grado di ostruzione vasale e nonostante il suo valore sia risultato maggiore tra i partecipanti con stenosi significative, ha fornito un risultato pari a 0 in 14 individui con stenosi coronariche non calcifiche e in 4 di questi casi si è trattato di stenosi coronariche significative.

Durante un follow-up di 5 anni, 11 partecipanti hanno presentato la necessità di essere sottoposti a posizionamento di stents coronarici medicati. Di questi pazienti, una quota significativa risultava essere stata esposta ad abacavir. L'odds ratio relativo alla possibilità di andare incontro a posizionamento di stent coronarico in relazione all'assunzione, attuale o pregressa, di abacavir è risultato 1.37 (95% CI 1.01-1.86). In conclusione, la malattia coronarica e il rischio di infarto acuto del miocardio costituiscono una problematica di rilievo nell'ambito della patologia legata all'infezione da HIV. I soggetti HIV+ presentano un più elevato rischio cardiovascolare quando confrontati con la popolazione generale e questo si associa a una precoce comparsa di ostruzioni coronariche significative, anche in assenza dei classici fattori di rischio cardiovascolare. La fisiopatologia dell'aterosclerosi coronarica in questa popolazione si discosta, almeno in parte, da quella della popolazione HIV negativa, come testimoniato dalla differente distribuzione osservata nella composizione delle placche ateromasiche. L'esposizione ai farmaci

antiretrovirali è tra le cause riconosciute dell'aumento del rischio cardiovascolare dei soggetti HIV+ e tra questi abacavir è stato in alcune casistiche associato ad un aumento diretto del rischio di infarto acuto del miocardio. La limitata numerosità del campione oggetto del nostro studio non permette di trarre conclusioni definitive; ad ogni modo i dati in nostro possesso sembrerebbero essere concordi rispetto alla rilevanza di tale associazione, seppure non potendo contribuire a chiarirne la patogenesi. In considerazione di ciò e di quanto evidenziato dalla presente casistica, riteniamo utile l'utilizzo dell'algoritmo D:A:D nella stratificazione del rischio cardiovascolare nei soggetti con infezione da HIV. Lo spessore mio-intimale carotideo si è confermato essere un affidabile strumento per la stratificazione del rischio cardiovascolare in relazione alla presenza ed entità delle stenosi coronariche. Al contrario, in ragione della considerevole presenza di stenosi coronariche non calcifiche, l'uso del calcium score nei soggetti con infezione da HIV potrebbe portare a una sottostima del rischio di eventi cardiovascolari acuti. L'uso di uno score basato su semplici parametri ematochimici come il PLR risulta promettente, in quanto ha mostrato associazione rispetto a valori elevati di IMT e alla presenza di stenosi coronariche significative, tuttavia ulteriori studi saranno necessari per confermare questo dato.

BIBLIOGRAFIA

1. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med*. 2012 Mar;18(3):182-92.
2. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/GHO/data-on-the-size-of-the-hiv-aids-epidemic>.
3. Notiziario dell'Istituto Superiore di Qualità. Volume 31 - Numero 9 Supplemento 1 – 2018.
4. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest*. 1989 Dec;84(6):1892-9.
5. Differential expression of interleukin-2 and gamma interferon in human immunodeficiency virus disease. *J Virol*. 2001 Oct;75(20):9983-5.
6. Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation. *J Clin Invest*. 1992 Feb;89(2):561-6.
7. Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is associated with an in vivo increase in B lymphocyte activation and immaturity. *J Immunol*. 1987 Jun 1;138(11):3720-4.
8. HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug;98(18):10362-7.
9. Functional studies of epidermal Langerhans cells and blood monocytes in HIV-infected persons. *J Immunol*. 1995 Apr;154(7):3506-15.
10. Monocyte accessory cell function in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Clin Immunol Immunopathol*. 1991 Jun;59(3):436-48.
11. Depletion in blood CD11c-positive dendritic cells from HIV-infected patients. *AIDS*. 1999 May;13(7):759-66.
12. Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood*. 2001 Nov;98(10):3016-21.
13. Defective postbinding lysis underlies the impaired natural killer activity in factor VIII-treated, human T lymphotropic virus type III seropositive hemophiliacs. *J Clin Invest*. 1986 Apr;77(4):1057-62.

14. Functional gamma delta T-lymphocyte defect associated with human immunodeficiency virus infections. *Mol Med.* 1997 Jan;3(1):60-71.
15. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997;387:183–8.
16. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4 (+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8869–73.
17. Gene expression and viral production in latently infected, resting CD4+ T cells in viremic versus aviremic HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1908–13.
18. Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. *J Clin Invest* 1986;77:1712–5.
19. Apoptotic killing of HIV-1-infected macrophages is subverted by the viral envelope glycoprotein. *PLoS Pathog* 2007;3:1281–90.
20. HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. *Nature* 2003;424:213–9.
21. Central nervous system damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS. *Annu Rev Neurosci* 2002;25:537–62.
22. Microglia in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *Glia* 2002;40:240–51.
23. Impaired Toll-like receptor 7 and 9 signaling: From chronic viral infections to cancer. *Trends Immunol* 2010;31:391–397.
24. HIV and inflammation. *Curr HIV Res* 2005;3:243–259.
25. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* 2008;112:2826–2835.
26. The gastrointestinal tract and AIDS pathogenesis. *Gastroenterology* 2009;136:1965–1978.
27. Susceptibility of human Th17 cells to human immunodeficiency virus and their perturbation during infection. *J Infect Dis* 2010;201:843–854.

28. Effective CD4⁺ T- cell restoration in gut associated lymphoid tissue of HIV-infected patients is associated with enhanced Th17 cells and polyfunctional HIV-specific T-cell responses. *Mucosal Immunol* 2008;1:475–488.
29. Reduction of HIV-1 RNA levels with therapy to suppress herpes simplex virus. *N Engl J Med* 2007;356:790–799.
30. Regulatory T cells and HIV-1 infection. *Viral Immunol* 2008; 21:285–291.
31. T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clin. Immunol.* 2008; 127:107–118.
32. Early immune senescence in HIV disease. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 2010; 7:4–10.
33. Premature immunosenescence in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy with low-level CD4 T cell repopulation. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 64:579–588.
34. Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. *AIDS.* 2001; 15:1749–1756.
35. The role of HIV in serious diseases other than AIDS. *AIDS.* 2008; 22:2409–2418.
36. Telomeres shortening during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990; 345:458–460.
37. Structure and function of telomeres. *Nature.* 1991; 350:569–573.
38. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8:729–740.
39. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood.* 2003 Apr 1;101(7):2711-20.
40. Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Study 185 Team. *N Engl J Med.* Aug 5 1999;341(6):385-393.
41. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373: 123–126.
42. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373: 117–122.

43. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *J Virol* 2010; 84: 9864 – 9878.
44. HIV population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995; 267: 483–489.
45. Mutation and control of the human immunodeficiency virus. *Math Biosci* 2008; 213: 93–102.
46. Linee Guida Italiane sull'utilizzo della Terapia Antiretrovirale e la gestione diagnostico-clinica delle persone con infezione da HIV-1. Ministero della Salute (pp. 150-153).
47. Cerebrospinal fluid HIV escape associated with progressive neurologic dysfunction in patients on antiretroviral therapy with well controlled plasma viral load. *AIDS* 2012. 26:1765–1774.
48. A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy. *Nature Reviews Microbiology* 2014; 12, 772–780.
49. Failure to maintain long-term adherence to highly active antiretroviral therapy: the role of lipodystrophy. *AIDS* 2001; 15:2441-4.
50. Self-reported symptoms after initiation of a protease inhibitor in HIV-infected patients and their impact on adherence to HAART. *HIV Clin Trials* 2001; 2:38-45.
51. Insulin resistance in the HIV-infected population: the potential role of mitochondrial dysfunction. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2005 Sep;5(3):255-62.
52. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J Infect Dis.* 2000 Jun;181 Suppl 3:S462-72.
53. Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 May;74(5):1045-52.
54. Protease inhibitors and cardiovascular outcomes in patients with HIV-1. *Lancet.* 2002 Nov;360(9347):1747-8.
55. Cardiovascular disease risk factors in HIV patients: association with antiretroviral therapy. Results from the DAD study. *AIDS.* 2003 May;17(8):1179-93.

56. Hyperlactatemia and antiretroviral therapy: the Swiss HIV Cohort Study. *Clin Infect Dis*. 2001 Dec;33(11):1931-7.
57. Management of hyperlactatemia: no need for routine lactate measurements. *AIDS*. 2001 Apr;15(6):795-7.
58. Bone disease in the setting of HIV infection: update and review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17:2413-2419.
59. Avascular necrosis of bone in human immunodeficiency virus infected patients. *Clin Imaging*. 1999 Sep-Oct;23(5):314-8.
60. Avascular necrosis of the bone in HIV-infected patients: incidence and associated factors. *AIDS*. 2002 Feb;16(3):481-3.
61. Osteonecrosis in HIV disease: epidemiology, etiologies, and clinical management. *AIDS*. 2003 Jan;17(1):1-9.
62. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1512-1531.
63. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med* 1997; 336:1276-1282.
64. Endothelial dysfunction and repair in the pathogenesis of stable and unstable fibroinflammatory atheromas. *Can J Cardiology* 2004; 20, Suppl B:16B-23B.
65. The role of shear stress in atherogenesis. *Lab Invest* 2005; 85:9-23.
66. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circ Res* 2011; 108:1133-45.
67. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:10679-84.
68. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: break of tolerance in the artery wall. *Thromb Haemost* 2011; 106:779-86.
69. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2506-12.

70. C-reactive protein is a marker for human immunodeficiency virus disease progression. *Arch Intern Med.* 2006 Jan 9; 166(1):64–70.
71. Interruption of antiretroviral therapy and risk of cardiovascular disease in persons with HIV-1 infection: exploratory analyses from the SMART trial. *Antivir Ther.* 2008; 13(2):177–87.
72. Low CD4+ T-cell count as a major atherosclerosis risk factor in HIV-infected women and men. *AIDS.* 2008 Aug 20; 22(13):1615–24.
73. Acute coronary syndrome in HIV patients: from pathophysiology to clinical practice. *Cardiovasc Diagn Ther* 2012;2:50–5.
74. Prognosis of Acute Coronary Syndrome in HIV-infected patients (PACS) Investigators. Acute coronary syndrome in human immunodeficiency virus-infected patients: characteristics and 1 year prognosis. *Eur Heart J* 2011;32:41–50.
75. Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. *PLoS Biol* 2006;4:e365.
76. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2007; 356: 1723–35.
77. HIV protease inhibitors promote atherosclerotic lesion formation independent of dyslipidemia by increasing CD36-dependent cholesteryl ester accumulation in macrophages. *J Clin Invest* 2003; 111:389–97.
78. Hypofibrinolytic state in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitor-containing highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29:441–9.
79. Use of human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors is associated with atherogenic lipoprotein changes and endothelial dysfunction. *Circulation.* 2001 Jul 17; 104(3):257–62.
80. Resistin levels in human immunodeficiency virus-infected patients with lipatrophy decrease in response to rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Jun; 90(6):3423–6.
81. Risk of myocardial infarction in patients with HIV infection exposed to specific individual antiretroviral drugs from the 3 major drug classes: the data collection on adverse events of anti-HIV drugs (D:A:D) study. *J Infect Dis.* 2010 Feb 1; 201(3):318–30.

82. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: a multi-cohort collaboration. *Lancet*. 2008 Apr 26; 371(9622):1417–26.
83. Inflammatory biomarkers and abacavir use in the Women’s Interagency HIV Study and the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS*. 2010 Jul 17; 24(11):1657–65.
84. Similar Reductions in Markers of Inflammation and Endothelial Activation after Initiation of Abacavir/Lamivudine or Tenofovir/Emtricitabine: The HEAT Study. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; Boston, MA. February, 2009
85. No Association of Myocardial Infarction with ABC Use: An FDA Meta-analysis. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; Boston, MA. February, 2009
86. Cardiovascular risk prediction in HIV-infected patients: comparing the Framingham, atherosclerotic cardiovascular disease risk score (ASCVD), Systematic Coronary Risk Evaluation for the Netherlands (SCORE-NL) and Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (D:A:D) risk prediction models. *HIV Medicine* (2016), 17, 289—297.
87. Modelling the 3-year risk of myocardial infarction among participants in the Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (DAD) study. *HIV Med*. 2003 Jan;4(1):1-10.
88. Predicting the risk of cardiovascular disease in HIV-infected patients: the data collection on adverse effects of anti-HIV drugs study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2010 Oct;17(5):491-501.
89. Cardiovascular risk assessment in persons with HIV infection in the developing world: comparing three risk equations in a cohort of HIV-infected Thais. *HIV Med*. 2011 Sep;12(8):510-5.
90. The predictive role of NLR and PLR for solid non-AIDS defining cancer incidence in HIV-infected subjects: a MASTER cohort study. *Infect Agent Cancer*. 2015 Oct 5;10:34.
91. Relationship of neutrophil-lymphocyte ratio with arterial stiffness and coronary calcium score. *Clin Chim Acta*. 2011 May 12;412(11-12):925-9.

92. Neutrophil to lymphocyte ratio and cardiovascular diseases: a review. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2013 Jan;11(1):55-9.
93. Association Between Hematological Indices and Coronary Calcification in Symptomatic Patients without History of Coronary Artery Disease. *N Am J Med Sci.* 2014 Sep; 6(9): 433–439.
94. Association of neutrophil/lymphocyte ratio with obstructive coronary artery disease and coronary artery calcium score detected by multislice computed tomography in type 2 diabetes mellitus patients. *Patient Prefer Adherence.* 2015; 9: 1023–1031.
95. The platelet-to-lymphocyte ratio as a predictor of all-cause mortality in patients with coronary artery disease undergoing elective percutaneous coronary intervention and stent implantation. *J Saudi Heart Assoc.* 2015 Jul;27(3):144-51.
96. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med* 1998; 128:262–9.
97. Arterial stiffness and carotid intima-media thickness in HIV infected patients. *Med Ultrason* 2011, Vol. 13, no. 2, 127-134.
98. Preclinical atherosclerosis due to HIV infection: carotid intima-medial thickness measurements from the FRAM study. *AIDS* 2009; 23:1841–9.
99. Carotid intima-media thickness among human immunodeficiency virus-infected patients without coronary calcium. *Am J Cardiol* 2012; 109:742–7.
100. HIV infection and carotid artery intima-media thickness: Pooled analyses across five cohorts of the NHLBI HIV-CVD Collaborative. *Clin Infect Dis.* 2016 Jul 15;63(2):249-56.
101. Carotid Artery Intima-Media Thickness and HIV Infection: Traditional Risk Factors Overshadow Impact of Protease Inhibitor Exposure. *AIDS.* 2005;19(9):927-933.
102. Radiation dose to patients from cardiac diagnostic imaging. *Circulation.* 2007; 116:1290–1305.
103. Three-dimensional, time-resolved motion of the coronary arteries. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2004; 6:663–673.

104. Dual-source spiral CT with pitch up to 3.2 and 75 ms temporal resolution: image reconstruction and assessment of image quality. *Med Phys*. 2009; 36:5641– 5653.
105. ACCF/ACR/SCCT/SCMR/ASNC/NASCI/SCAI/SIR 2006 appropriateness criteria for cardiac computed tomography and cardiac magnetic resonance imaging: a report of the American College of Cardiology Foundation Quality Strategic Directions Committee Appropriateness Criteria Working Group, American College of Radiology, Society of Cardiovascular Computed Tomography, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance, American Society of Nuclear Cardiology, North American Society for Cardiac Imaging, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Interventional Radiology. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48:1475–1497.
106. Coronary CT versus MR angiography: pro CT the role of CT angiography. *Radiology*. 2011; 258:329–339.
107. Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. *JAMA*. 2004; 291:210–215.
108. Soluble CD163, a novel marker of activated macrophages, is elevated and associated with noncalcified coronary plaque in HIV-infected patients. *J Infect Dis* 2011; 204:1227–1236.
109. Increased coronary atherosclerotic plaque vulnerability by coronary computed tomography angiography in HIV-infected men. *AIDS* 2013; 27:1263–1272.
110. Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013.
111. Statins: new American guidelines for prevention of cardiovascular disease. *Lancet* 2013; 382:1762–1765.
112. Clinical Epi Group of the French Hospital Database on HIV. Impact of specific NRTI and PI exposure on the risk of myocardial infarction: a case-control study nested within FHDH ANRS CO4. In: Program and abstracts of the 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; February 8-11, 2009; Montreal. Abstract 43LB
113. HIV infection is associated with an increased prevalence of coronary noncalcified plaque among participants with a coronary artery calcium score of zero: Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *HIV Med*. 2015 Nov;16(10):635-9.

114. Myocardial extracellular matrix: an ever-changing and diverse entity. *Circ Res.* 2014 Feb 28;114(5):872-88.
115. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev.* 2012 Apr;92(2):635-88.
116. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14:608–616.
117. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation.* 2010;122:2727–2735.
118. Myocardial Extracellular Volume Quantification by Cardiovascular Magnetic Resonance and Computed Tomography. *Curr Cardiol Rep.* 2018 Mar 6;20(3):15.
119. Interstitial myocardial fibrosis assessed as extracellular volume fraction with low-radiation-dose cardiac CT. *Radiology.* 2012 Sep;264(3):876-83.
120. Estimation of myocardial extracellular volume fraction with cardiac CT in subjects without clinical coronary artery disease: A feasibility study. *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2016 May-Jun;10(3):237-41.
121. Estimation of myocardial fibrosis in humans with dual energy CT. *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2018 Dec 18. pii: S1934-5925(18)30255-7.
122. Feasibility of extracellular volume quantification using dual-energy CT. *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2019 Jan - Feb;13(1):81-84.
123. Measurement of myocardial extracellular volume fraction by using equilibrium contrast-enhanced CT: validation against histologic findings. *Radiology.* 2013 Nov;269(2):396-403.