

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato in Ipertensione e prevenzione del rischio cardiovascolare



**EFFETTI DELLA TERAPIA ANTIRETROVIRALE
SULLA STRUTTURA E FUNZIONE ARTERIOSA
IN UNA POPOLAZIONE AFFETTA DA HIV**

Relatore: Prof. Guido GRASSI

Correlatore: Prof.ssa Cristina GIANNATTASIO

Tesi di dottorato di:
Francesca Carla Maria **BIANCHI**
Matricola 582581

Anno Accademico 2012-2013

Alla mia famiglia

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1	INFEZIONE DA HIV	1
1.1.1	<i>Epidemiologia</i>	1
1.1.2	<i>Modalità di Infezione</i>	2
1.2	TERAPIA ANTIRETROVIRALE (HAART)	6
1.2.1	<i>Inibitori Nucleosidici della Transcriptasi Inversa (NRTI)</i>	7
1.2.2	<i>Inibitori Non-Nucleosidici della Transcriptasi Inversa (NNRTI)</i>	7
1.2.3	<i>Inibitori delle proteasi (PI)</i>	8
1.3	RISCHIO CARDIOVASCOLARE NELLA POPOLAZIONE HIV POSITIVA	10
1.3.1	<i>Fattori di rischio tradizionali</i>	10
1.3.2	<i>Malattia da HIV di per sé</i>	10
1.3.3	<i>Ruolo dei farmaci antiretrovirali</i>	15
1.3.4	<i>Osservazioni cliniche</i>	16
1.4	ATEROSCLEROSI E ARTERIOSCLEROSI	23
1.4.1	<i>Struttura e funzione arteriosa</i>	23
1.4.2	<i>Patogenesi dell'aterosclerosi</i>	26
1.4.3	<i>Rigidità arteriosa e funzione endoteliale</i>	33
1.4.4	<i>Fattori in grado di modificare la rigidità arteriosa</i>	35
2	SCOPO	43
3	METODI	44
3.1	RECLUTAMENTO	44
3.2	PULSE WAVE VELOCITY	45
3.3	DISTENSIBILITÀ CAROTIDEA	47
3.4	SPESSORE INTIMO-MEDIALE	49
3.5	VALUTAZIONE DELLA FUNZIONE ENDOTELIALE	50
3.6	PROTOCOLLO	53
3.7	ANALISI STATISTICA	54
4	RISULTATI	55
4.1	CARATTERISTICHE DI POPOLAZIONE	55
4.2	MARKER SURROGATI	57
5	DISCUSSIONE	63
6	BIBLIOGRAFIA	68

1 INTRODUZIONE

1.1 INFEZIONE DA HIV

L'infezione da virus HIV è alla base di una patologia cronico-persistente che vede nel sistema immunitario (in particolare nei linfociti T-CD4) il principale bersaglio. La progressiva diminuzione dei linfociti comporta un'immunodepressione che, nella sua forma più severa, prende il nome di Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (AIDS). Questo nome fu coniato nel 1982 durante un congresso promosso dalla Federal Drug Administration (FDA) in seguito alla descrizione, ad opera di Michael Gottlieb (ricercatore statunitense), di giovani omosessuali ammalatisi di patologie tipiche dell'immunodepressione quali la polmonite da P.Carinii o il sarcoma di Kaposi. Nel 1983 sia Luc Montagnier (dell'istituto Pasteur di Parigi) [1] che Robert Gallo (del National Cancer Institute Americano) isolarono, da linfonodi di pazienti affetti, un virus che i primi chiamarono LAV (virus associato a linfoadenopatia) e i secondi HTLV-III (virus umano della leucemia a cellule T di tipo III). Solo nel 1986, a seguito di un acceso dibattito internazionale, si concluse che si trattava dello stesso virus a cui fu assegnato l'attuale nome di HIV (Human Immunodeficiency Virus).

1.1.1 Epidemiologia

Attualmente il numero di persone affette da HIV nel mondo secondo l'ultimo Global Report emanato da UNAIDS è di **35 milioni** di individui contro 33 milioni nel 2007. Tale incremento è dovuto soprattutto al prolungarsi della durata di vita delle persone con HIV reso possibile sia dal miglioramento delle cure disponibili che dalla maggior accessibilità ai farmaci. Infatti, il numero di nuovi casi nel 2012 è stimato a circa **2,3 milioni** (2 milioni di adulti e **260.000** bambini), mentre nel 2008 era di 2,7 milioni (2,3 milioni di adulti e 430.000 bambini). Stiamo assistendo quindi a un rallentamento dell'epidemia, significativo soprattutto per quello che riguarda i bambini. È

indubbio che l'applicazione delle strategie di prevenzione materno infantile abbia prodotto risultati visibili nonostante il raggiungimento dell'obiettivo "Zero new infections in children" sia ancora però lontano. I morti nel 2012 sono stati **1,6 milioni**, contro 2 milioni nel 2008.

L'AIDS rimane comunque la malattia infettiva con la più alta mortalità seguita dalla tubercolosi, con 1,4 milioni di morti all'anno, e dalla malaria con 1,2 milioni di morti. Per quanto riguarda la diffusione geografica, l'Africa si conferma come il continente più colpito dall'HIV, con **25 milioni** di persone infette, cioè il 4,7% della popolazione adulta, mentre 3,9 milioni di malati si trovano in Asia. Nel Nord America vivono 1,3 milioni di persone con HIV, lo 0,5% della popolazione adulta, mentre in Europa occidentale 860.000 persone, lo 0,2% della popolazione adulta [2].

In Italia nel 2012 sono state segnalate 3853 nuove diagnosi di infezione da HIV, un dato stabile rispetto agli anni precedenti, che corrisponde a un tasso di incidenza di 6,5 nuovi casi ogni 100.000 abitanti. Il 26% delle persone diagnosticate è di nazionalità straniera. L'età mediana è di 38 anni per i maschi e 36 per le femmine.

Mentre negli anni '80 e '90 il principale fattore di rischio era costituito dall'uso di droghe per via endovenosa, attualmente la maggioranza delle nuove infezioni, come avviene in molti altri paesi del mondo, è attribuibile ai rapporti sessuali (42,7% rapporti eterosessuali, 38% rapporti omosessuali).

Il 55,8% delle persone diagnosticate HIV+ nel 2012 è arrivato alla diagnosi quando già i CD4 erano al di sotto di 350 per mm³ (late presenters). Il motivo di queste diagnosi tardive sta nella scarsa consapevolezza del rischio di infezione **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**

1.1.2 Modalità di Infezione

Il virus HIV si lega alle cellule T ospiti e penetra al loro interno attraverso le molecole CD4+ e i recettori delle chemochine. Dopo l'adesione, l'RNA e gli enzimi dell'HIV vengono rilasciati nella cellula ospite. La replicazione virale

richiede che la trascrittasi inversa, una DNA polimerasi RNA-dipendente, copi l'RNA dell'HIV, producendo una copia di DNA provirale. Questo processo è soggetto a errori e causa frequentemente mutazioni. Il DNA provirale penetra nel nucleo della cellula ospite e viene integrato nel DNA dell'ospite, mediante un processo che coinvolge l'integrasi dell'HIV. Ad ogni replicazione cellulare, il DNA provirale integrato viene duplicato assieme al DNA dell'ospite. Il DNA provirale viene trascritto in RNA e tradotto nelle proteine dell'HIV, comprese le glicoproteine dell'envelope 40 e 120. Le proteine dell'HIV vengono assemblate in virioni, a livello della superficie interna della membrana plasmatica, e gemmano poi dalla superficie cellulare; ogni cellula ospite può produrre migliaia di virioni. La proteasi, un altro enzima dell'HIV, cliva le proteine virali dopo la gemmazione, convertendo il virione nella forma infettante.

Anche l'immunità umorale è compromessa. L'iperplasia dei linfociti B (secernenti anticorpi) nei linfonodi causa linfadenopatia generalizzata e aumento della produzione di anticorpi, diretti contro antigeni incontrati precedentemente, che spesso induce ipergammaglobulinemia. I livelli totale di anticorpi diretti contro Ag incontrati in precedenza possono essere incredibilmente elevati mentre la risposta contro nuovi Ag è difettiva o assente. Sia durante la fase iniziale che in un secondo tempo il sistema linfatico è fondamentale per lo stabilirsi e il propagarsi dell'infezione da HIV. L'architettura dei linfonodi che inizialmente è preservata viene poi completamente sovvertita così che l'efficienza dei linfonodi di intrappolare i virioni diminuisce, portando a un equilibrio della carica virale tra le cellule del sangue periferico e le cellule linfonodali. La maggior parte dei pazienti va incontro a una fase viremica durante l'infezione primaria.

Circa il 50-70% dei soggetti infettati va incontro a una sindrome acuta (retrovirale) che compare dopo circa 3-6 settimane dall' infezione primaria. Essa è caratterizzata da febbre, faringite, artralgie, mialgie, linfadenopatie, eruzione cutanea maculopapulare, ulcerazioni mucocutanee, nausea, vomito, diarrea e meningite asettica; dura circa 1-2 settimane e si risolve

spontaneamente. Nonostante la forte risposta immunitaria evocata dall'infezione primaria il virus con pochissime eccezioni, non viene eliminato dall'organismo. Si sviluppa invece un'infezione cronica che dura in media circa 10 anni. Durante questo periodo di latenza clinica l'attiva replicazione virale progredisce e il numero di linfociti T CD4+ gradualmente diminuisce, sono però rilevabili pochi segni clinici o addirittura nessuno. La velocità di progressione della malattia è direttamente correlata ai livelli plasmatici di HIV RNA. Quando questi sono elevati, la progressione verso la malattia sintomatica è più rapida. Nei pazienti non trattati o in quelli in cui la terapia non è stata in grado di controllare la replicazione virale dopo un certo periodo di tempo (spesso dell'ordine di anni) il numero di linfociti T CD4+ scende al di sotto di una soglia critica (circa 200/ul) e i pazienti diventano suscettibili a infezioni opportunistiche.

Grazie all'introduzione della terapia antiretrovirale, l'epidemiologia e la storia naturale dell'AIDS hanno subito un notevole cambiamento. Si è infatti potuto osservare un rilevante incremento della sopravvivenza dei pazienti HIV-positivi (passata da 1.2 ad oltre 16 anni [3]) con una diminuzione della mortalità tanto maggiore quanto più intensa è la terapia antiretrovirale [4]. A tal proposito, le curve di Kaplan-Meier confermano l'importante declino della mortalità ad 1 anno che passa dal 57% della prima era della terapia antiretrovirale al 4% dell'ultima era (*Figura 1*). La terapia antiretrovirale ha però così determinato una cronicizzazione dell'infezione che ha introdotto nuovi problemi nella gestione dei pazienti. Si è assistito ad una variazione delle cause di morte: le patologie direttamente connesse all'AIDS sono passate dal 65 al 56% (con una notevole diminuzione dell'eziologia infettiva; *Figura 2* [5]), mentre si è assistito a un notevole incremento delle altre cause dal 9 al 32%. In particolare le malattie cardiache rappresentano il 21% delle morti totali, i traumi il 7.7% e le epatopatie il 5% [6].

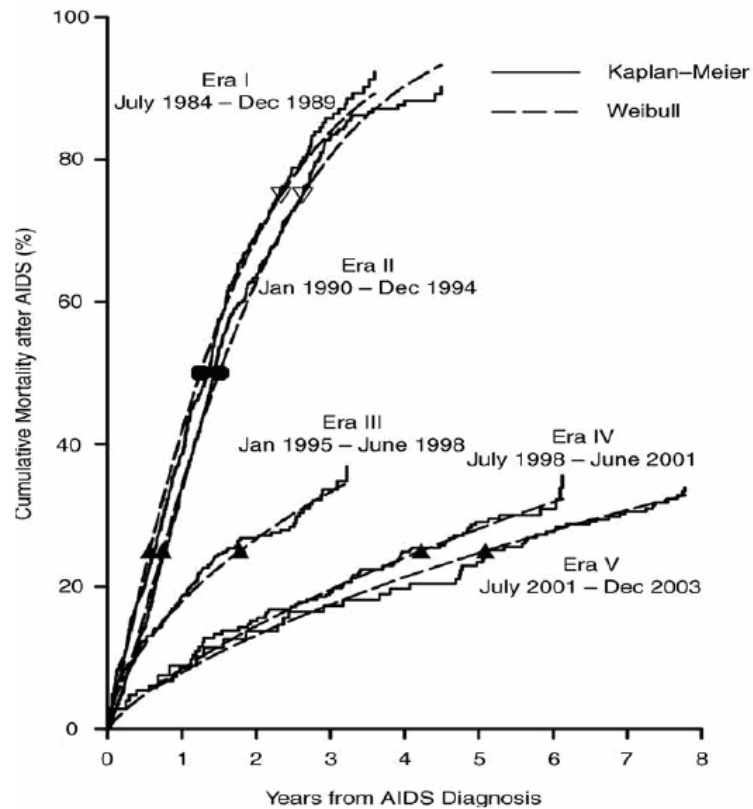


Figura 1 Curve di Kaplan-Meier nelle differenti ere della terapia antiretrovirale. (Tratto da Schneider MF et al. Patterns of the hazard of death after AIDS through the evolution of antiretroviral therapy: 1984-2004. *AIDS* 2005;19:2009-18).

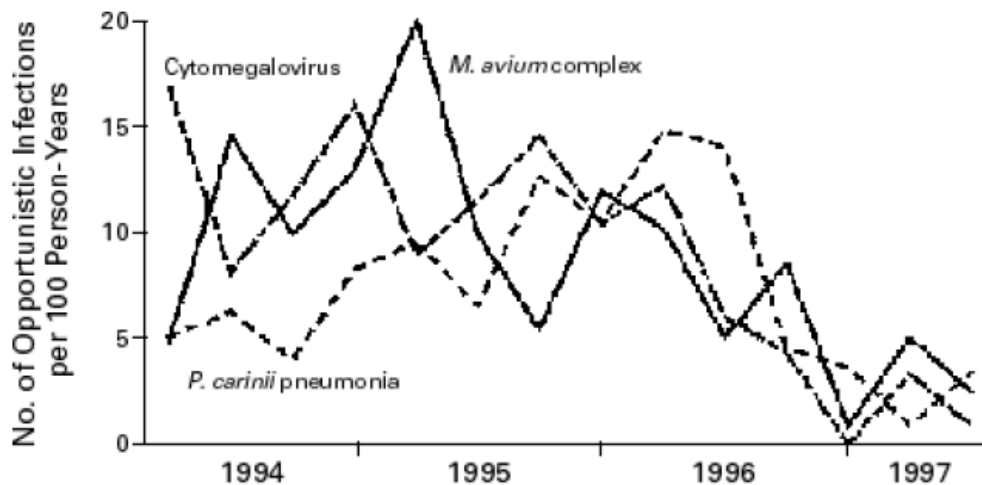


Figura 2 Incidenza delle principali infezioni opportunistiche dopo l'introduzione dell'HAART. (Tratto da Palella FJ et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *NEJM* 1998;13:853-60).

1.2 TERAPIA ANTIRETROVIRALE (HAART)

Dopo l'introduzione della terapia antiretrovirale altamente attiva (HAART) il tasso di mortalità di tali pazienti è calato in maniera inequivocabile, tanto che attualmente più dell'85% dei sieropositivi sopravvive per più di 10 anni dal momento dell'infezione.

Nel corso degli anni l'obiettivo delle terapie dell'infezione da HIV è passato dal mantenere in vita il paziente a mantenerlo in vita con una buona qualità di vita e trattare in modo efficace le comorbidità [7].

Attualmente vengono utilizzate le sei categorie di farmaci antiretrovirali qui elencati:

- I. Inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI)
- II. Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI)
- III. Inibitori delle proteasi (PI)
- IV. Inibitori di fusione
- V. Antagonisti del recettore CCR5
- VI. Inibitori dell'integrasi.

Generalmente, secondo le linee guida emanate dalla WHO, la decisione di iniziare il trattamento con HAART è basata in prima istanza sulla conta di linfociti CD4+ (CD4+ count <350/mm³) e sulla carica virale e, secondariamente, sulla presunta compliance del paziente [8].

Tutti questi farmaci non sono in grado di uccidere il virus, ma agiscono bloccandone la replicazione. Per questo motivo diverse linee guida nazionali ed internazionali propendono per l'utilizzo di tre differenti farmaci antiretrovirali in combinazione, di solito facenti parte di 2 famiglie, per esempio si utilizza un farmaco NNRTI associato a due componenti NRTI, oppure un PI associato a due NRT. I più utilizzati, nonché i più studiati, sono i farmaci facenti parte delle prime tre famiglie che qui di seguito approfondiremo.

1.2.1 Inibitori Nucleosidici della Transcriptasi Inversa (NRTI)

I farmaci appartenenti a questa classe sono stati i primi ad essere utilizzati nella terapia dell'infezione da HIV; il capostipite di questi infatti, la Zidovudina (AZT), è stata utilizzata fin dal 1987. I risultati che si ottenevano erano però solo transitori, e questo era dovuto al fatto che il suo impiego in monoterapia provocava rapidamente l'insorgenza di resistenze.

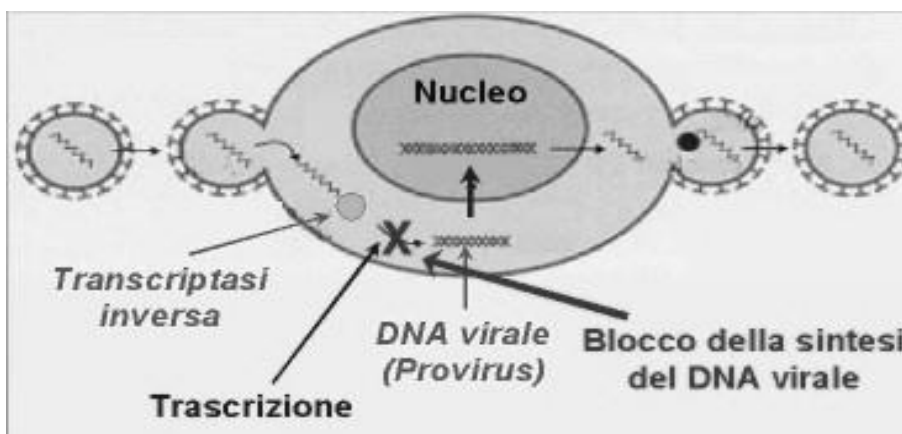


Figura 3 Meccanismo d'azione degli Inibitori Nucleosidici della Transcriptasi Inversa

Questi farmaci sono in grado di inibire il processo di replicazione del virus mediante il blocco della trascrizione dell'RNA virale in DNA provirale; agiscono sostituendosi alle basi azotate durante la trascrizione, in modo che il DNA provirale neoformato sia incompleto e quindi incapace di originare nuove particelle virali.

1.2.2 Inibitori Non-Nucleosidici della Transcriptasi Inversa (NNRTI)

Questa classe di farmaci fu scoperta circa 10 anni fa, ma il loro sviluppo era stato ostacolato dagli scarsi risultati ottenuti in seguito all'impiego in monoterapia, che aveva comportato la rapida insorgenza di resistenza.

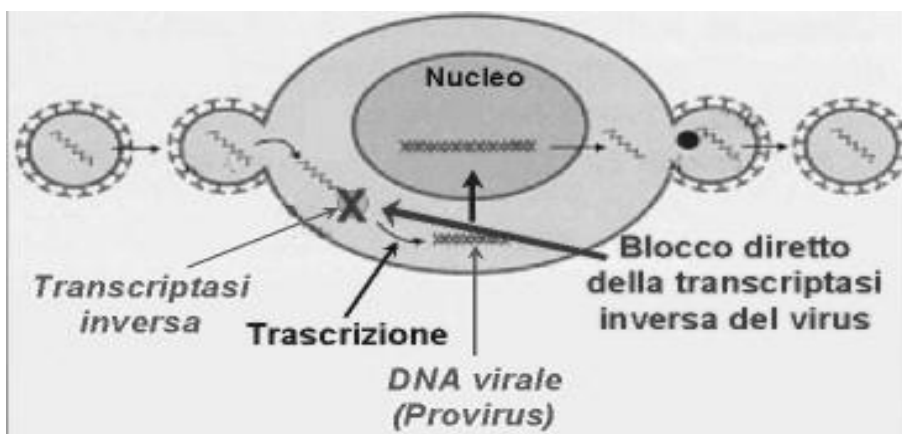


Figura 4 Meccanismo d'azione degli Inibitori Non Nucleosidici della Transcriptasi Inversa

Anche questi, come i farmaci della classe precedente, sono inibitori della transcriptasi inversa, ma agiscono con un meccanismo diverso: si legano direttamente al sito attivo dell'enzima, bloccandone l'azione ed impedendo così che avvenga la formazione del DNA provirale. Questi farmaci hanno una buona biodisponibilità ed una lunga emivita, per cui possono essere somministrati solo una o due volte al giorno.

1.2.3 Inibitori delle proteasi (PI)

Sono i farmaci che hanno radicalmente modificato l'impatto della terapia antiretrovirale, essendo caratterizzati da una potente attività di blocco della replicazione virale.

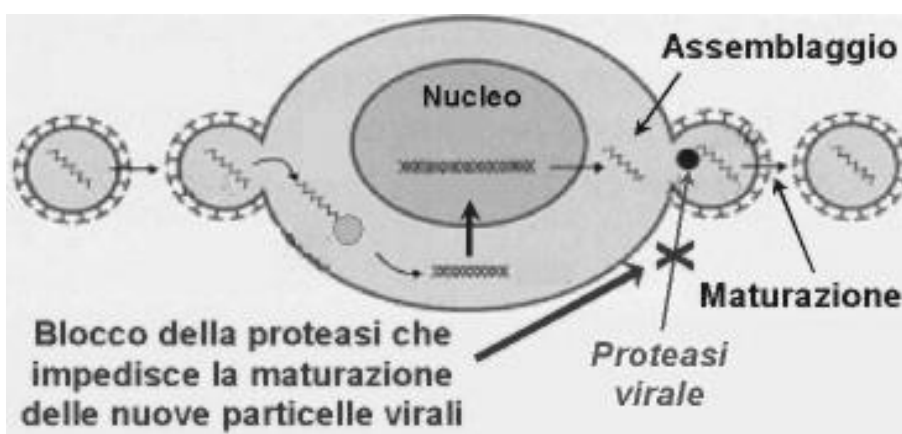


Figura 5 Meccanismo d'azione degli Inibitori delle proteasi

Agiscono nell'ultima fase del ciclo replicativo dell'HIV, inibendo la proteasi virale, un enzima che permette la maturazione delle nuove particelle virali rendendole a loro volta infettanti.

Il motivo principale dell'insuccesso di una terapia è dovuto alla insorgenza di resistenza ai farmaci; ciò succede quando il virus va incontro a delle mutazioni della propria struttura genetica che gli permettono di "sfuggire" all'azione del farmaco. Poiché le mutazioni compaiono durante la replicazione, è evidente che la loro insorgenza è la diretta conseguenza di una incompleta soppressione dell'attività virale, quale si verifica per esempio in caso di assunzione scorretta della terapia o di inadeguatezza della stessa.

Per ridurre il rischio che ciò accada sono essenziali due fattori:

- utilizzare più farmaci in combinazione fra loro;
- ottimizzare l'aderenza del paziente alla terapia.

L'impiego di una terapia di combinazione con farmaci diversi consente di aggredire il virus da più parti, riducendo così la possibilità che questo possa andare incontro a mutazioni e quindi a sviluppare resistenza.

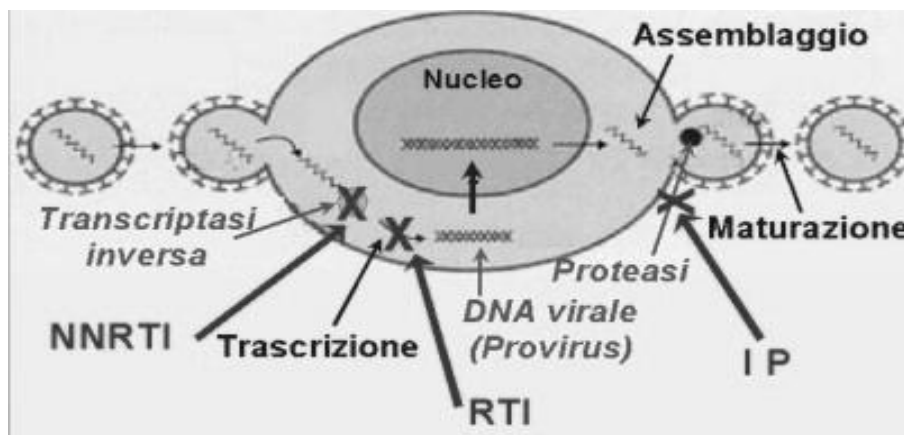


Figura 6 Meccanismo d'azione della terapia di combinazione

1.3 RISCHIO CARDIOVASCOLARE NELLA POPOLAZIONE HIV POSITIVA

In termini di rischio cardiovascolare, benché i pazienti HIV positivi condividano i fattori di rischio cardiovascolare classici con la popolazione generale, è importante sottolineare come l'infezione e il conseguente stato infiammatorio e la terapia antiretrovirale stessa siano in grado di influenzare i fattori di rischio cardiovascolare, aggravandoli e quindi incrementando l'incidenza di tali eventi

1.3.1 Fattori di rischio tradizionali

I fattori di rischio cardiovascolare che colpiscono la popolazione generale interessano anche quella HIV+, o perché già presenti prima dell'infezione, o perché acquisiti successivamente. Tra i fattori di rischio classici (età > 55 anni, sesso maschile, familiarità per evento cardiovascolare giovanile- < 55 anni se maschio, < di 65 anni se femmina-, colesterolemia totale > 190 mg/dL e LDL > 115 mg/dL, dislipidemia familiare, ipertensione arteriosa, diabete e fumo) quello maggiormente presente è il tabagismo, mentre ipertensione e diabete sono quelli meno comuni (considerando anche la più giovane età di questi soggetti) [9].

A sostegno dell'importanza dei fattori di rischio classici, in un'analisi dell'HIV Outpatient Study Cohort età, dislipidemia, ipertensione arteriosa, diabete mellito e tabagismo risultarono maggiormente correlati al rischio cardiovascolare rispetto ai fattori specifici del paziente HIV+ (carica virale, conta dei T-CD4 e terapia antiretrovirale) [10].

1.3.2 Malattia da HIV di per sé

L'infezione virale da HIV è un fattore di rischio cardiovascolare indipendente per l'azione pro-infiammatoria e le alterazioni che essa determina sullo stato metabolico. L'HIV provoca uno stato infiammatorio cronico di lunga durata tanto che, nei casi di infezione non trattata con terapia antiretrovirale, si ha un incremento dei markers infiammatori, tra cui la PCR (Proteina C Reattiva),

tale proteina è strettamente associata allo sviluppo di malattia cardiovascolare aterotrombotica perfino nei soggetti sani [11][12]. Attualmente il trattamento antiretrovirale è in grado di migliorare questo stato di infiammazione sistemica, ma non è in grado di azzerare i livelli di PCR. Dal momento che in letteratura si ha anche evidenza dell'esistenza di correlazione tra valori di PCR lievemente incrementati e lo sviluppo delle complicanze dell'aterosclerosi in futuro [11], i pazienti sieropositivi, nonostante vengano sottoposti a terapia antiretrovirale, restano soggetti ad un aumentato rischio cardiovascolare. L'associazione tra i livelli di PCR e l'incidenza di infarto del miocardio nei pazienti HIV-positivi è stata valutata da Triant et al. facendo riferimento ad un grande database ospedaliero in cui erano raccolti i dati relativi ai livelli di PCR antecedenti l'infarto del miocardio (IMA) di diverse migliaia di pazienti, 487 dei quali erano HIV-positivi. Il risultato fu che, nei pazienti sieropositivi e nei soggetti con elevati valori di PCR, il rischio di IMA era superiore di circa due volte rispetto ai soggetti sani [13]. Quando, invece, nei pazienti erano contemporaneamente presenti infezione da HIV ed elevati valori di PCR, il rischio di IMA quadruplicava. Inoltre, sebbene questo studio non sia stato in grado di dimostrare l'associazione tra farmaci antiretrovirali quali gli inibitori nucleosidici/non nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI/NNRTI) e il rischio di IMA, è tuttavia stata osservata una significativa associazione tra valori di PCR ed utilizzo degli inibitori delle proteasi.

Inoltre sembrerebbe che il virus stesso possa essere un fattore di rischio per lo sviluppo di aterosclerosi coronarica. Diversi studi hanno confermato la presenza nel plasma di elevati livelli di prodotti delle cellule endoteliali ad attività pro-coagulativa, tra i quali il fattore di von Willebrand e la trombomodulina solubile [14]. Oltre a ciò si è anche registrata un'associazione diretta tra la carica virale e frammenti di protrombina in pazienti sieropositivi non sottoposti ad HAART; questo dato suggerisce che livelli aumentati della viremia portano ad un aumentato rischio di eventi tromboembolici [15].

In un grande trial eseguito da Kuller et al si è scoperto che il riscontro di elevati livelli di RNA viremico erano correlati ad elevati livelli di D-dimero e di In-

terleuchina-6, i quali suggeriscono un'attivazione delle vie metaboliche della coagulazione e dell'infiammazione con un conseguente aumento della mortalità [16].

La relazione tra infezione da HIV e incremento del rischio cardiovascolare è evidente anche nelle conclusioni dello studio SMART (Strategies for Management of Antiretroviral Therapy) [17]. Questo studio confrontò la terapia antiretrovirale continua e quella guidata dalla conta dei T-CD4 ovvero con sospensione all'ottenimento del controllo viremico e alta conta linfocitaria e ripresa in seguito a nuovo decremento dei valori. Alla base della seconda strategia vi era l'idea che questa potesse portare benefici relativi alla diminuzione degli effetti collaterali dei farmaci e dunque ad un miglioramento della qualità di vita [18]. Furono randomizzati 5,472 pazienti: 2,720 al trattamento continuo e 2,752 a quello guidato dalla conta dei T-CD4. Gli end-point erano le infezioni da germi opportunisti, la mortalità per qualunque causa e gli eventi maggiori cardiovascolari, epatici e renali. Dalle analisi effettuate risultò come il secondo gruppo presentasse una maggiore progressione della malattia e un aumento di tutti gli end-point tanto da sospendere lo studio per evidente superiorità della terapia in continuo. Se era prevedibile che la terapia discontinua fosse associata a una maggiore mortalità globale e a un maggior numero di infezioni opportunistiche, sorprese l'alto numero di eventi cardiovascolari, epatici e renali rispetto al gruppo in terapia in continuo. Lo studio STACCATO applicò il medesimo protocollo ma con un cut-off di TCD4 per la terapia discontinua maggiore rispetto allo studio SMART senza però raggiungere una numerosità sufficiente [19]. In entrambi gli studi i soggetti sottoposti a terapia discontinua presentavano maggiori livelli dei marker ematici di infiammazione e disfunzione endoteliale con rapido decremento in seguito all'inizio della terapia [20]. Questi risultati, insieme a quelli visti precedentemente, sono interpretabili come prova del ruolo primario dell'infezione virale nel determinare disfunzione endoteliale ed incremento degli eventi cardiovascolari. Infatti la terapia continua, sopprimendo la replicazione virale, determina una diminuzione degli eventi e dei marker circolanti di infiammazione. Ancora in

un altro studio eseguito da Kaplan, si è giunti alla conclusione che una bassa conta di linfociti T CD4+ è un fattore di rischio indipendente per l'insorgenza di lesioni carotidee caratterizzate da incremento dell'IMT, sebbene la carica virale di HIV non lo sia [21]. Oliviero et al., infine, hanno preso in considerazione due markers surrogati di aterosclerosi (IMT e FMD) ed hanno trovato una correlazione tra peggioramento di questi markers ed elevati valori di HIV-RNA o di TNF α (Tumor Necrosis Factor α) [22].

Si è inoltre visto che l'infezione da HIV influenza la funzione endoteliale per mezzo di molteplici meccanismi; da una parte mediante l'attivazione del sistema monocitico, con conseguente produzione di citochine, e dall'altra con un effetto diretto delle proteine virali *tat* e *gp120*, le quali, oltre ad attivare alcune vie metaboliche del sistema immunitario, vanno ad interferire con il metabolismo dell'ossido nitrico.

- La proteina *tat* stimola la produzione di citochine (IL-6, IL-8, TNF- α) da parte dei monociti, provoca l'espressione di molecole di adesione e diminuisce la trascrizione di NO-sintetasi endoteliale (eNOS) con conseguente decremento della vasodilatazione [23].
- La proteina di superficie *gp120* ha una duplice azione; da una parte stimola la produzione di NO da parte dei macrofagi attivati, dall'altra agisce direttamente sull'endotelio provocando un' aumentata espressione delle molecole di adesione per i leucociti con conseguente azione lesiva [24]. Secondo Schechter et al. la proteina *gp120* agisce anche a livello della cellula muscolare liscia causando una maggior produzione di fattore tissutale (tF), il quale innesca la cascata coagulativa portando alla trombosi del vaso [25].

Da questi enunciati si può ben comprendere che perfino l'ossido nitrico (NO) è un mediatore di disfunzione endoteliale in corso di infezione da HIV: l'NO è prodotto in eccesso dalle cellule endoteliali per via dell'iperpressione dell'enzima NO-sintetasi inducibile (iNOS) che consegue alla ridotta espressione di eNOS. L'NO in eccesso reagisce con i radicali liberi dell'ossigeno

andando a formare peroxinitriti che causano danno ossidativo all'endotelio ed una diminuzione della Flow Mediated Dilation [23].

Analogamente a quanto accade in tutti i casi di infezione, anche in corso di infezione da HIV, l'attivazione del sistema immunitario provoca incremento della produzione di PCR ed innalza i livelli di Interleuchine (soprattutto l'interleuchina 6, IL-6) e di INF γ (interferone γ); queste inducono l'espressione di markers endoteliali tra cui molecole solubili di adesione endoteliale (sVCAM-1) e molecole solubili di adesione intracellulare (sICAM-1) ed innalzano i livelli di Fattore di von Willebrand. Questi markers sono indici di attivazione cronica dell'endotelio e, quindi, di disfunzione endoteliale, e possono scatenare attivazione piastrinica che, a sua volta, determina up-regulation delle molecole di adesione, instaurando così un circolo vizioso risultante in un'amplificazione del danno endoteliale[26]

Un'altra causa di incremento del rischio cardiovascolare è la dislipidemia determinata dal virus stesso. Queste alterazioni furono descritte fin dal 1989, Grunfeld et al. riscontrarono una diminuzione del colesterolo totale ed LDL ed un aumento dei trigliceridi in seguito all'infezione [27] dovuto probabilmente ad un'aumentata produzione epatica di VLDL e/o ad una ridotta clearance delle stesse. Tutt'ora non si è compreso con certezza quale sia il meccanismo che provochi la variazione del profilo lipidico nel paziente sieropositivo. Un'ipotesi accreditata suggerisce che ciò sia dovuto ad un processo di immagazzinamento dei lipidi all'interno dei macrofagi: il virus HIV provocherebbe infatti una disfunzione di ABCA-1 (ATP-binding cassette transporter-1), trasportatore deputato all'uscita di colesterolo dai macrofagi [28].

Inoltre le infezioni croniche, e quindi anche quella da HIV, determinano leucocitosi e stress ossidativo che, a loro volta, favoriscono l'ossidazione delle LDL e la loro deposizione in parete svolgendo ruolo pro-aterogeno e determinando disfunzione endoteliale causando alterazioni della regolazione di

importanti funzioni quali il tono vascolare, l'aggregazione, la migrazione leucocitaria e l'anti-ossidazione [29].

1.3.3 Ruolo dei farmaci antiretrovirali

Se il beneficio dell'HAART sulla mortalità nei pazienti HIV+ è innegabile, non si può però non tenere presente che già a pochi anni dalla sua introduzione fu descritta la comparsa di alterazioni metaboliche che sembrerebbero essere alla base dell'incremento del rischio di eventi cardiovascolari.

Diversi studi hanno preso in considerazione l'azione della HAART sulla mortalità per cause cardiovascolari con risultati contrastanti riassunti nella seguente tabella:

Referenza	Anno	Num.	Tipo	Conclusioni
D:A:D study group [30],[31],[32]	Dic. 1999 - Feb. 2005	23,468	Osservazionale	Aumento del rischio cardiovascolare connesso all'esposizione a PI e NRTI (abacavir e didanosina).
SMART/INSIGHT study group [33]	Gen. 2002 - Gen. 2006	4,544	Trial Randomizzato	Aumento del rischio cardiovascolare connesso all'esposizione a NRTI (abacavir).
Vaughn G et al. [34]	1999-2000	5,667	Retrospettivo-Osservazionale	Aumento del rischio cardiovascolare connesso all'esposizione ai PI.
Rickerts V et al. [35]	Gen. 1983 - Dic. 1998	4,993	Retrospettivo	Aumento del rischio cardiovascolare connesso all'esposizione ai PI.
Mary-Krause M et al. [36]	1992-1999	34,976	Retrospettivo	Aumento del rischio cardiovascolare connesso all'esposizione ai PI.
Bozzette SA et al. [37]	Gen.1993 - Giu. 2001	36,766	Retrospettivo	Nessun incremento del rischio cardiovascolare nei pazienti in terapia con PI.
Lichtenstein K et al. [38]	1993 - 2005	1,744	Retrospettivo	Diminuzione del rischio cardiovascolare nei pazienti in terapia con PI.

Klein D et al. [39]	1996 - 2001	4,159	Osservazionale	Aumento del rischio di coronaropatia negli HIV+ ma non connesso all' esposizione ai PI.
El-Sadr WM et al. [40]	Gen. 2002 - Gen. 2006	5,472	Trial randomizzato	Aumento del rischio cardiovascolare nel gruppo in terapia discontinua.

Tabella 1: Riassunto dei principali studi relativi al rapporto tra terapia antiretrovirale e rischio cardiovascolare.

1.3.4 Osservazioni cliniche

All'ultima Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) 2013 di Atlanta uno studio condotto sulle tre coorti INSIGHT/SMART, ESPRIT e SILCAAT [41] evidenzia che in 262 pazienti con eventi gravi non AIDS-correlati e decesso, l'impatto delle comorbidità non AIDS correlate è ancora importante: il primo evento è neoplastico nel 36% dei pazienti, cardiovascolare nel 26%, mentre decessi o altri eventi non AIDS correlati si sono registrati nel 27% dei casi.

Losina et al [42] hanno confermato l'evidenza che la malattia cardiovascolare è comunque una delle patologie età-correlate più evidenti negli HIV+: utilizzando una simulazione di malattia da HIV in 6 coorti, 3 maschili e tre femminili, che rappresentavano la popolazione generale, i sieronegativi ad alto rischio di contrarre HIV e gli HIV+ di recente diagnosi, hanno evidenziato che la presenza di malattia da HIV aumenta di 10 e 20 anni il rischio di malattia cardiovascolare negli HIV-infetti.

Il Veterans Aging Cohort Study conclude invece che benchè i soggetti adulti HIV+ siano ad aumentato rischio di infarto miocardico (incidenza +81%), tumori (+31%) e nefropatia cronica (+55%) rispetto ai non infetti, queste comorbidità età-correlate si manifestano ad un'età simile rispetto alla popolazione generale, dopo correzione per i fattori di rischio tradizionali [43], confermando quindi il ruolo del virus HIV, ma non quello dell'invecchiamento, come fattore di rischio.

In sintesi, la popolazione HIV-positiva presenta un incremento del rischio cardiovascolare determinato dai fattori di rischio classici, dall'infezione virale e dalle alterazioni metaboliche causate dai farmaci antiretrovirali. Questo ha portato le società internazionali a stendere linee guida per il trattamento delle alterazioni metaboliche e la valutazione del rischio cardiovascolare specifiche per questa popolazione. Sono state individuate strategie di screening più aggressive rispetto alla popolazione generale indicando la necessità di una valutazione dei fattori di rischio cardiovascolari alla diagnosi, prima di iniziare la terapia antiretrovirale, a breve distanza da ogni sua modifica e comunque almeno una volta all'anno (*Tabella 2*) [44].

Valutazione del rischio cardiovascolare nel paziente HIV-positivo	
Anamnesi	Patologica prossima Patologica remota Farmacologica
Lipidi plasmatici	Trigliceridi Colesterolo totale, LDL ed HDL
Metabolismo glucidico	Glicemia a digiuno
Ipertensione	Misurazione della pressione arteriosa
Composizione corporea	BMI Circonferenza addominale Rapporto vita-fianchi Valutazione clinica della lipodistrofia

Tabella 2: Valutazione del rischio cardiovascolare nel paziente HIV-positivo secondo le linee guida EACS. Tratto, con modifiche, da [44].

1.3.4.1 *Sindrome metabolica*

La sindrome metabolica è una costellazione di fattori di rischio cardiovascolare che include ipertensione, obesità centrale, insulino-resistenza, diabete mellito e dislipidemia. L'unione di queste alterazioni, anche se di grado lieve, determina un notevole incremento del rischio di eventi cardiovascolari sia nella popolazione generale [45] che in quella HIV+ [46].

Lo studio SIMONE (SIndrome Metabolica ONE [47]) si è occupato di studiare questa sindrome negli HIV+ italiani confrontandoli con la popolazione generale (progetto PAMELA). La prevalenza risultò essere del 22% (maggiore rispetto al 15% degli HIV-) e anche le alterazioni che compongono la diagnosi risultarono differenti: si rilevò una minore prevalenza di ipertensione e diametro della circonferenza vita mentre dislipidemia e alterazioni del metabolismo glucidico erano maggiormente presenti rispetto ai soggetti sani.

Alla base della sindrome metabolica vi sarebbe l'insulino-resistenza. Oltre al diabete mellito (di cui è l'antecedente temporale) gli elevati livelli di insulina sono in grado di determinare dislipidemia (per aumento della lipolisi adipocitaria) e ipertensione (tramite desensibilizzazione all'azione vasodilatatrice dell'insulina e aumentata vasocostrizione da attivazione del sistema nervoso simpatico).

Di seguito analizzeremo l'influenza dell'infezione e della terapia antiretrovirale sulle singole componenti di questa eterogenea sindrome.

1.3.4.2 Dislipidemia

Come visto precedentemente sia l'infezione che la terapia antiretrovirale sono coinvolti nella genesi della dislipidemia. In particolare sono implicati i PI (tramite alterazioni nell'espressione delle SREBP) e gli NRTI (tramite la tossicità mitocondriale) mentre nella classe dei NNRTI solo l'efavirenz è stato connesso a lieve ipertrigliceridemia.

Gli approcci da considerare nel trattamento della dislipidemia nel paziente HIV+ riguardano: le modificazioni dello stile di vita (dieta ipocalorica- ipolipidica e attività fisica) e la terapia delle condizioni associate (ipertensione e diabete mellito). Nel caso di fallimento della terapia comportamentale le linee guida europee [44] consigliano la modifica dello schema terapeutico, introducendo farmaci antiretrovirali meno dislipidemicici, solo nel caso in cui possa essere mantenuta una soppressione virale ottimale.

Nel caso di terapia con PI, per esempio, si può passare ad un altro farmaco della stessa classe noto per i minori effetti dislipidemici o a un NNRTI. Se il paziente è in terapia con stavudina o zidovudina si può passare a un NRTI con minori effetti dislipidemici, quali il tenofovir.

I farmaci ipolipemizzanti vengono introdotti se le modifiche alla terapia antiretrovirale non permettono di raggiungere valori ottimali dei lipidi plasmatici.

Nel caso di pazienti in terapia con PI va ricordato che anche le statine e i fibrati vengono metabolizzati dal citocromo P450 con possibili effetti di induzione/inibizione e quindi incremento del rischio di tossicità [48]. In questi pazienti la pravastatina è quella che ha dimostrato il profilo di sicurezza migliore ed è pertanto la preferita.

Spesso è necessaria la contemporanea somministrazione di statine e fibrati per raggiungere il target terapeutico [49].

Calza et al. [50] e Van der Valk et al. [51] dimostrarono una maggiore efficacia con l'introduzione di un farmaco ipolipemizzante piuttosto che modificando la terapia antiretrovirale; nonostante questo le linee guida consigliano, prima di introdurre un nuovo farmaco, di effettuare un tentativo con il secondo approccio [52].

1.3.4.3 Insulino-resistenza

L'insulino-resistenza nell'HIV è multifattoriale [53]; essa è relata ai classici fattori di rischio della popolazione generale (obesità, sedentarietà e genetica), ma anche alle alterazioni determinate dalla terapia. Come visto precedentemente sia i PI che NRTI (principalmente zidovudina e didanosina) sono implicati direttamente (tramite alterazione dell'espressione di GLUT-4 per i primi e tossicità mitocondriale per i secondi) e indirettamente, tramite lipodistrofia e dislipidemia.

La prevalenza del diabete mellito nei soggetti HIV+ varia dal 2 al 14% e, come nella popolazione generale, incrementa notevolmente il rischio di eventi

cardiovascolari. Questo è stato confermato da un'analisi del D:A:D che dimostrò un rischio relativo di 1.35 rispetto agli HIV+ senza diabete mellito [54].

La terapia non si discosta da quella del paziente sieronegativo comprendendo le modifiche dello stile di vita, la terapia delle condizioni associate e la terapia specifica fino all'ottenimento del controllo glicometabolico.

I farmaci antiretrovirali maggiormente implicati nelle alterazioni glucidiche possono essere sostituiti con altri meno noti per determinarle (es. passare a un PI più recente o a un NNRTI), nonostante la letteratura non sia concorde sui risultati di questa strategia [55].

Il farmaco di prima scelta soprattutto in pazienti con adiposità del tronco è la metformina. In considerazione della possibile acidosi lattica va prestata attenzione al contemporaneo trattamento con NRTI [56]. Le sulfaniluree potrebbero essere utilizzate in alternativa alla metformina soprattutto nei pazienti che non presentano adiposità del tronco. Se non viene raggiunto il target si può associare alla metformina o alle sulfaniluree un altro ipoglicemizzante orale appartenente p.e alla classe dei tiazolidinedioni [56].

Nel caso di impossibilità al controllo glicemico con i farmaci ipoglicemizzanti orali viene introdotta l'insulina.

1.3.4.4 Lipodistrofia

La lipodistrofia è stata descritta per la prima volta nel 1998 in pazienti in terapia con PI [57]. Viene ulteriormente distinta in lipoatrofia (perdita di adiposo sottocutaneo a livello di faccia, arti e natiche) e lipoipertrofia, cioè accumulo adiposo a livello addominale, viscerale, dorsocervicale, sovrapubico e al seno. Lipoatrofia e lipoipertrofia possono essere contemporaneamente presenti (forme miste) ed associarsi o meno ad alterazioni lipidiche plasmatiche. La prevalenza nei pazienti in HAART (benché variabile in base alla definizione usata) si attesta intorno al 34% per la lipoatrofia, 44% per la lipoipertrofia e 14% per le forme miste [58]. Per la diagnosi sono stati proposti alcuni score che permettono di ottenere una migliore sensibilità e specificità tramite l'uso di tecniche di imaging. Gli alti costi e le problematiche (per esempio assenza

di limiti di normalità definiti [58]) non ne permettono la piena applicazione rendendo spesso la diagnosi solamente clinica. I fattori di rischio per la lipoa-trofia sono l'età e la severità dell'infezione (TCD4 e carica virale) mentre l'esposizione a PI e ad analoghi della timidina (zidovudina e stavudina) lo sono per la lipoipertrofia [58].

I farmaci antiretrovirali svolgono un ruolo primario nella patogenesi della lipo-distrofia come dimostrato dalla minor prevalenza nel braccio in terapia di-scontinua del già citato studio STACCATO [19].

Oltre ai meccanismi patogenetici delle singole classi farmacologiche, sono state segnalate alterazioni ormonali quali una diminuita risposta al GH [59] e minori livelli di adipocitokina (ormone prodotto dagli adipociti) [60], mentre i livelli di leptina (ormone regolatore dell'omeostasi glico-metabolica) sono stati direttamente connessi al fenotipo (bassi nella lipoatrofia, alti nella lipoipertro-fia e intermedi nelle forme miste [61]).

Fliers et al. ipotizzarono la presenza di alterazioni del sistema nervoso sim-patico e parasimpatico alla base della lipodistrofia, ma questa teoria non è mai stata ulteriormente indagata [62].

Nel trattamento della lipodistrofia, oltre alle modifiche dello stile di vita, sono disponibili diversi approcci che comprendono le modificazioni della terapia antiretrovirale per esempio passando da un NRTI ad un altro noto per non determinare lipodistrofia (es. da stavudina ad abacavir [63]) o ad un PI [64] con risultati principalmente sulla lipoatrofia [65], un approccio cosmetico chi-rurgico e non solo, un approccio farmacologico con Metformina che riduce l'accumulo di grasso a livello viscerale, ma aggrava la lipoatrofia periferica [66] o Tiazolidindioni anche se l'efficacia sulla lipoatrofia è ancora in discus-sione con risultati opposti in alcuni studi [67]. Esistono anche degli approcci sperimentali che utilizzano il GH con riduzione significativa dell'adipe troncu-lare e viscerale, l'utilizzo di testosterone nei maschi affetti con ridotto livello determina riduzione dell'adipe al tronco e agli arti, ma non a livello viscerale. Per quanto riguarda l'utilizzo di statine il trattamento con pravastatina è stato

utilizzato in un unico studio dimostrando aumento dell'adipe sottocutaneo e centrale [68].

1.3.4.5 Ipertensione

Al contrario di tutte le alterazioni finora viste, solo pochi studi si sono occupati del rapporto tra ipertensione e HIV.

L'introduzione dell'HAART ha determinato un notevole incremento della prevalenza dell'ipertensione fino all'attuale 30-50% circa [69].

Essa è probabilmente da correlare ad un'aumentata rigidità arteriosa, infatti Seaberg et al. individuarono un maggiore incremento della pressione sistolica rispetto alla diastolica, in maniera simile a quanto avviene nell'ipertensione isolata dell'anziano [70].

Secondo lo studio di Crane et al. gli unici farmaci antiretrovirali dimostratisi associati allo sviluppo di ipertensione furono lopinavir/ritonavir (Odds Ratio 3) e tenofovir/lamivudina (OR 2.3) [71].

Non sono stati affrontati studi specifici sulla terapia dell'ipertensione nel paziente HIV+ nel quale vengono applicate le informazioni note dalla popolazione generale.

Nella scelta del farmaco è da tener presente che i bloccanti del recettore dell'angiotensina ed i calcio antagonisti vengono metabolizzati dal citocromo P450 e devono quindi essere somministrati con cautela insieme ai PI per evitare possibili interazioni [72].

1.4 ATEROSCLEROSI E ARTERIOSCLEROSI

Come già accennato in precedenza le infezioni croniche, e quindi anche quella da HIV, determinano leucocitosi e stress ossidativo che, a loro volta, favoriscono l'ossidazione delle LDL e la loro deposizione in parete svolgendo quindi un ruolo pro-aterogeno. L'aterosclerosi è una malattia delle arterie elastiche (quali aorta, carotidi e iliache) e delle grosse e medie arterie muscolari (quali coronarie e poplitee), solo raramente interessa le arterie più piccole. È considerata come una risposta di tipo immune/infiammatorio dell'intima ad un danno tissutale. Le fasi precoci della lesione si sviluppano sotto l'endotelio vascolare e non sono associate a morte cellulare ma sono caratterizzate da una modulazione delle funzioni dell'endotelio stesso che si traduce in un aumento dell'adesività dei monociti circolanti alle pareti del vaso. L'ingresso dei monociti nello spazio subendoteliale rappresenta infatti la prima risposta all'ipercolesterolemia e porta alla formazione di cellule schiumose (foam cell, provviste di vacuoli lipidici nel citoplasma). Altri fattori che contribuiscono all'iniziazione e progressione della lesione includono l'ipertensione, il fumo, meccanismi immunologici ed infezioni virali.

Più di recente è stata dimostrata l'esistenza di un altro processo lesivo legato all'aumento della pressione arteriosa, ed indipendente da quello aterosclerotico, tale processo è caratteristico dell'invecchiamento e non coinvolge tanto le cellule quanto le componenti inanimate responsabili delle caratteristiche meccaniche della parete vasale, denominato arteriosclerosi [73].

1.4.1 Struttura e funzione arteriosa

La parete delle arterie è formata da tre strati concentrici:

- tunica intima, luminale,
- tunica media, intermedia,
- tunica avventizia, esterna.

La tunica intima consiste nell'endotelio vascolare ancorato alla lamina elastica interna da un sottile strato di collagene e fibre di elastina. Le componenti cellulari principali della tunica intima sono le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce. L'ammontare della muscolatura liscia e del tessuto elastico presente nella tunica intima varia a seconda dell'età. Dopo la nascita l'intima si ispessisce fino a divenire più grossa della tunica media dopo l'adolescenza. È tipicamente durante l'età adulta che l'intima può divenire marcatamente spessa a causa dell'aterosclerosi. Lo spessore dell'intima non risulta essere uniforme, viene infatti descritto un aumento adattativo classificabile come eccentrico (associato a diramazioni ed orifici di vasi) o diffuso (non associato a geometrie peculiari dei vasi). Questi ispessimenti sono associati a regioni soggette a particolari stress meccanici e/o tensori. In presenza di stimoli aterogenici sono queste le aree in cui le lesioni si formano per prime e divengono più facilmente sintomatiche.

Tra l'intima e la media si frappone la lamina elastica interna, composta da un foglietto fenestrato di fibre elastiche, con interposte cellule muscolari lisce e vari componenti della matrice connettivale extracellulare. La matrice extracellulare della parete arteriosa è formata da collagene, elastina, glicoproteine e proteoglicani. Collagene ed elastina sono gli elementi portanti della parete ed il loro turn-over è regolato dalle metalloproteinasi, endopeptidasi zincodipendenti in grado di degradare l'elastina ed il collagene ed indurre nuova deposizione. In condizioni di alterato equilibrio, le metalloproteinasi sono in grado di alterare la struttura di queste molecole e la loro concentrazione relativa, creando un collagene meno efficace e molecole di elastina frammentate e poco resistenti.

La tonaca media è il luogo in cui principalmente risiedono le proprietà meccaniche delle arterie elastiche periferiche, la sua componente portante è costituita da un certo numero di strati di lamelle elastiche. La zona interlamellare consiste di cellule muscolari lisce e connettivo, formato

principalmente da mucopolisaccaridi. Le cellule muscolari lisce rappresentano una popolazione alquanto eterogenea, includendo fenotipi contrattili, proliferativi, sintetici o apoptotici. La quantità relativa di ciascun fenotipo dipende dall'età, dalla localizzazione nell'albero vascolare e dalle condizioni patologiche eventualmente presenti, ad esempio un lieve stato infiammatorio cronico.

Il terzo strato è costituito dall'avventizia, abbondante soprattutto nelle arterie più centrali, costituita principalmente da collagene e fibroblasti. La quantità di collagene viene determinata nelle fasi precoci dello sviluppo. Esso ha un turnover molto lento, pur essendo costantemente soggetto a modificazioni chimiche, come la rottura di legami crociati o la glicazione importanti ai fini delle modificazioni delle proprietà meccaniche di queste arterie.

Le componenti strutturali della parete vascolare sono il determinante principale della compliance arteriosa, costituite da collagene ed elastina. Il contenuto relativo di queste molecole è normalmente reso stabile da un lento, ma dinamico processo di produzione e degradazione che, se viene alterato, porta all'irrigidimento vascolare. La perdita di questo equilibrio, che conduce all'iperproduzione di collagene anomalo e a diminuite quantità di elastina, è influenzata da forze emodinamiche, come la pressione endoluminale, ma anche da fattori "estrinseci", come ormoni, natriemia, glicemia e stimoli infiammatori. L'elastina è una proteina con un'emivita misurabile in decenni; la rottura delle sue fibre porta all'irrigidimento e alla dilatazione dell'aorta con l'invecchiamento, proprio perchè la sua funzione principale è quella di sopportare e attutire gli stress e gli stiramenti dei vasi elastici centrali.

L'intima dei vasi rigidi si presenta istologicamente costituita da cellule endoteliali disposte in modo disordinato, eccesso di collagene, molecole di elastina interrotte, infiltrati di cellule muscolari lisce, macrofagi e cellule mononucleate, metalloproteinasi della matrice, TGFbeta, molecole di adesione intracellulare e citochine.

Per quanto riguarda le componenti cellulari l'arterial stiffness viene determinata non solo da alterazioni strutturali, ma anche dai segnali delle cellule endoteliali e dal tono delle cellule muscolari lisce, influenzate dall'attività del sistema nervoso autonomo, ormoni, sostanze vasoattive prodotte localmente e farmaci.

Lo stress di parete e alcune sostanze, come l' angiotensina II, endoteline, plasmina, trombina, radicali liberi, rappresentano uno stimolo lesivo, al quale l'endotelio risponde liberando citochine, diminuendo l'NO, stimolando l'ipertrofia e il tono delle cellule muscolari lisce e i processi di fibrosi. Le cellule vascolari, infatti, così come i macrofagi e polimorfonucleati, producono collagenasi (MMP-1, MMP-8, MMP-13) ed elastasi (MMP-7 e serino-proteasi) che vanno ad alterare il pattern connettivale e a rimodellare le componenti della matrice, aumentando la quota di condroitin solfato, eparansolfato, proteoglicani e fibronectina.

1.4.2 Patogenesi dell'aterosclerosi

Sono state proposte due ipotesi principali per spiegare la patogenesi dell'aterosclerosi: l'ipotesi lipidica e l'ipotesi del danno endoteliale cronico. Esse sono probabilmente correlate.

Secondo l'**ipotesi lipidica** un aumento delle LDL plasmatiche provoca l'ingresso delle LDL stesse nella parete arteriosa, con conseguente accumulo di lipidi nelle cellule muscolari lisce e nei macrofagi (cellule schiumose). Le LDL contribuiscono anche all'iperplasia delle cellule muscolari lisce e alla loro migrazione verso le regioni intimali e sotto-intimali in risposta a fattori di crescita. Le LDL vengono modificate od ossidate in tale ambiente e diventano così più aterogene. Le particelle di colesterolo contenute nelle LDL sono anche più suscettibili a essere modificate e ossidate. Le LDL modificate od ossidate sono chemiotattiche per i monociti e provocano la loro migrazione nell'intima, la loro precoce comparsa nelle strie lipidiche e la loro trasformazione e stabi-

lizzazione come macrofagi nel compartimento sotto-intimale. Recettori posti sulla superficie dei macrofagi facilitano l'ingresso delle LDL ossidate all'interno di queste cellule, trasformandole in macrofagi carichi di lipidi e cellule schiumose. Le LDL ossidate sono anche citotossiche per le cellule endoteliali e possono essere responsabili della loro disfunzione o scomparsa dalle lesioni più avanzate.

Un modello di aterosclerosi è stato studiato in scimmie nutrite con una dieta ricca di colesterolo. Entro 1-2 settimane dall'induzione dell'ipercolesterolemia, i monociti hanno aderito alla superficie dell'endotelio arterioso grazie all'espressione di recettori specifici, si sono spostati nello strato sottoendoteliale e hanno accumulato lipidi (diventando cellule schiumose). Anche le cellule muscolari lisce con fenotipo proliferativo accumulano lipidi. A mano a mano che le strie lipidiche e le placche fibrose si accrescono e sporgono nel lume, lo strato sottoendoteliale risulta esposto alla corrente ematica nelle sedi di danno endoteliale e si formano aggregati piastrinici e trombi murali. Il rilascio di fattori di crescita da parte delle piastrine aggregate può aumentare la proliferazione della muscolatura liscia a livello dell'intima. Alternativamente, l'organizzazione e l'incorporazione del trombo all'interno della placca aterosclerotica possono contribuire alla sua crescita.

L'ipotesi del danno endoteliale cronico vede invece il danno endoteliale, dovuto a diversi meccanismi, responsabile della perdita di endotelio con conseguente adesione delle piastrine allo strato sottoendoteliale, aggregazione piastrinica, chemiotassi di monociti e linfociti T e rilascio di fattori di crescita derivati dalle piastrine e dai monociti, che inducono la migrazione delle cellule muscolari lisce dalla media nell'intima dove si replicano e sintetizzano tessuto connettivo e proteoglicani e formano una placca fibrosa. Anche altre cellule (p.es., macrofagi, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce arteriose) producono fattori di crescita che possono contribuire all'iperplasia delle cellule muscolari lisce e alla produzione di matrice extracellulare.

L'endotelio, infatti, svolge una funzione critica nel mantenimento del flusso sanguigno e dell'integrità vascolare, in condizioni fisiologiche favorisce la vasodilatazione, contrasta l'adesione dei monociti e presenta caratteristiche antitrombotiche e fibrinolitiche. In alcuni tratti del ramo arterioso, danni cronici dell'endotelio possono portare a una aumentata assunzione di LDL e una maggiore adesione dei monociti sulla parete arteriosa, eventi che danno inizio al processo aterosclerotico. Una delle manifestazioni precoci della disfunzione endoteliale è una vasocostrizione anormale causata dalla lisolecitina, un derivato della perossidazione delle particelle LDL.

La lesione iniziale dell'endotelio si sviluppa quando i monociti attraversano la barriera endoteliale localizzandosi nell'intima. Dopo la penetrazione i monociti si convertono in macrofagi incamerando grandi quantità di lipidi e divenendo cellule schiumose (così chiamate per l'aspetto del citoplasma). In concomitanza si ha il rilascio di fattori di crescita, sostanze citotossiche e procoagulanti.

Il reclutamento dei monociti circolanti è dovuto a diversi fattori quali: la variazione della permeabilità vascolare, l'alterazione dell'espressione di recettori per l'adesione cellulare, l'intervento di mediatori dell'infiammazione, la presenza di LDL chimicamente poco modificate.

L'attivazione dell'endotelio aumenta inoltre l'adesività per gli elementi figurati del sangue (fattori di adesione: selectine, integrine, membri della superfamiglia delle Ig).

Le LDL sono normalmente coinvolte nel trasporto di colesterolo e nutrienti attraverso le pareti dei vasi per arrivare alle cellule. L'ingresso nelle cellule è modulato dai recettori per le LDL, la cui sintesi è regolata dalla quantità di colesterolo presente all'interno della cellula. Il flusso di LDL VLDL e IDL attraverso le pareti vasi è regolato direttamente dalle rispettive concentrazioni plasmatiche, anche se è la ritenzione specifica delle lipoproteine nello spazio

subendoteliale, anziché l'entità del trasporto, a determinare le modificazioni della parete arteriosa. Le LDL devono subire delle modificazioni chimiche come l'ossidazione, l'acetilazione e la coniugazione con aldeidi per essere internalizzate nei macrofagi. Il processo coinvolge anche altri meccanismi come la fagocitosi, l'aggregazione di LDL, la formazione di complessi con proteoglicani, la formazione di immunocomplessi e l'idrolisi enzimatica.

L'ossidazione delle LDL avviene in due fasi.

Nella prima (**LDL parzialmente ossidate**) dopo l'accumulo nello spazio sub-endoteliale l'apoB (porzione proteica delle LDL) può essere lievemente ossidata dalle cellule vascolari residenti. Le LDL parzialmente ossidate promuovono l'infiammazione e stimolano le cellule vascolari a produrre fattori per il reclutamento dei monociti ed il loro differenziamento in macrofagi all'interno dell'intima. La suscettibilità alla perossidazione dei lipidi è maggiore nei soggetti con fattori di rischio come CHD, diabete mellito e fumo. Lo sbilanciamento dell'equilibrio tra le forze pro-ossidanti e anti-ossidanti è importante nell'insorgenza dell'aterosclerosi.

Nella seconda fase (**LDL completamente ossidate**) l'ossidazione delle LDL inizia con la penetrazione dei monociti all'interno dell'intima e la loro conversione in macrofagi. Questi ultimi stimolano l'ulteriore perossidazione delle LDL con modificazione anche della porzione proteica che acquista una maggiore carica negativa. La modificazione della parte proteica porta ad un calo di riconoscimento da parte del recettore per le LDL a favore dei recettori dei macrofagi. L'ingresso delle LDL completamente ossidate (OxLDL) nei macrofagi, al contrario delle LDL, non è soggetto a downregulation, quindi il macrofago può riempirsi di lipidi divenendo una cellula schiumosa (foam cell).

Le LDL completamente ossidate (**OxLDL**) sono quindi responsabili del:

- Reclutamento monociti e linfociti T.
- Inibizione della motilità dei macrofagi nell'intima.

- Effetto citotossico con rilascio di lipidi ed enzimi lisosomiali da parte delle cellule distrutte.
- Inibizione della dilatazione del vaso endotelio-dipendente.
- Promozione della formazione di trombi.
- Azione immunogenica (non presente nelle LDL native).

La migrazione e la proliferazione delle cellule muscolari lisce sono i principali eventi nello sviluppo della placca fibrosa. I lipidi ossidati presenti nelle lesioni aterosclerotiche stimolano la produzione di fattori di crescita ed altre molecole normalmente non espressi nelle pareti arteriose che possono indurre la proliferazione e la chemiotassi delle cellule muscolari lisce (SMC). Normalmente le SMC formano una capsula fibrosa attraverso la deposizione di una matrice di nuovo tessuto connettivo e l'accumulo di lipidi intracellulari ed extracellulari. La capsula assume la struttura di una matrice collagenosa con all'interno SMC. Anche le SMC si trasformano, in misura minore, in cellule schiumose. Anche la matrice extracellulare della placca partecipa agli eventi di adesione, proliferazione e migrazione legati allo sviluppo della lesione. Il processo di formazione della matrice non è legato alla presenza di OxLDL.

Alcuni macrofagi-cellule schiumose possono uscire dall'intima esportando le lipoproteine in accumulo mentre altri macrofagi muoiono nelle lesioni rilasciando il loro contenuto lipidico, contribuendo così alla formazione di un core lipidico altamente trombogenico. L'apoptosi dei macrofagi sembra derivare dalla mancanza di un fattore di crescita specifico, associata alle grandi quantità di TNF- α presente nelle lesioni aterosclerotiche. È anche possibile che i lipidi extracellulari provengano dalle LDL plasmatiche legate a glicosaminoglicani, collagene o fibrinogeno senza essere passate per i macrofagi. La calcificazione della lesione imprigiona il colesterolo nel calcio mineralizzato. Nelle lesioni avanzate è possibile trovare cristalli di colesterolo anche all'interno dei macrofagi.

L'ispessimento dell'intima durante il processo aterosclerotico è legato ad una sua neovascolarizzazione. I microvasi hanno un ruolo fondamentale nell'aterogenesi in quanto nutrono la lesione nascente e possono trasportare e fornire fattori di crescita, molecole di adesione, sostanze vasocostrittrici o vasodilatatorie e altro.

La placca aterosclerotica può accrescersi lentamente e in vari decenni dar luogo a una stenosi grave o progredire fino all'occlusione totale dell'arteria. Con il tempo, la placca diventa calcifica. Alcune placche sono stabili, ma altre, specialmente quelle ricche di lipidi e di cellule infiammatorie (p.es., macrofagi) e coperte da un sottile cappuccio fibroso, possono andare incontro a fissurazione o rottura spontanee, esponendo il contenuto della placca al flusso ematico. Queste placche sono instabili o vulnerabili e sono più strettamente associate alla comparsa di un evento ischemico acuto. La rottura della placca stimola la trombosi; il trombo può embolizzare, occludere rapidamente il lume fino a provocare una sindrome coronarica acuta o diventare gradualmente parte della placca, contribuendo alla sua crescita.

La progressione della lesione delle arterie coronariche è tipicamente imprevedibile, veloce e non lineare. Le lesioni sembrano attraversare cicli di rottura e riparazione con periodi di instabilità clinica. Anche l'accelerata proliferazione delle cellule muscolari lisce (SMC) e la sintesi di nuova matrice extracellulare rivestono un ruolo nella progressione delle placche. È possibile che le lesioni siano causate da successive rotture e riparazioni delle placche a livello della parete dei vasi.

Nel corso degli ultimi anni sono stati individuati numerosi fattori meccanici, cellulari e molecolari che contribuiscono alla rottura della placca [74],[75],[76]. La maggior parte delle volte la rottura della placca si verifica al bordo nella regione di contatto tra la placca e la parete del vaso adiacente. Quest'area, infatti, è ricca di cellule infiammatorie ed è anche maggiormente esposta alle forze dello stress legato al flusso (stress tangenziale, shear stress) [75],[76].

La placca ad alto rischio di rottura è caratterizzata da una capsula fibrosa sottile e da un elevato contenuto lipidico che influenzando le proprietà biochimiche della placca stessa ne aumentano la possibilità di rottura. Al contrario la fibrosi e la calcificazione sembrano diminuire il rischio di rottura [74], [76], [77]. La rottura di placca sembra verificarsi più frequentemente negli uomini dislipidemicici mentre l'erosione è più comune tra le donne fumatrici [76], [77].

Il processo infiammatorio svolge un ruolo centrale nella genesi della rottura della placca. I macrofagi e i linfociti T si accumulano all'interno della placca aterosclerotica in conseguenza dell'espressione di molecole di adesione sui monociti, sulle cellule endoteliali e sui leucociti; inoltre il rilascio di citochine proinfiammatorie e di chemochine (come la proteina-1 chemiotattica per i monociti) favorisce l'accumulo di altre cellule infiammatorie nella placca [78]. La metalloproteasi della matrice tra cui collagenasi e gelatinasi sono rilasciate dai macrofagi e degradano il collagene che fornisce resistenza al cappuccio fibroso [75]. Gli inibitori tissutali della metalloproteasi della matrice vengono normalmente espressi dalle cellule muscolari lisce vascolari. Tuttavia, a livello dell'area vulnerabile del cappuccio fibroso predominano i macrofagi, mentre le cellule muscolari lisce sono scarse, creando uno squilibrio tra gli enzimi deputati alla degradazione della matrice cellulare e i loro inibitori [75]. Questi riscontri indicano che uno stimolo infiammatorio causa una "tempesta biochimica" entro la placca ad alto rischio, portando alla rottura del suo cappuccio fibroso. L'aterotrombosi stessa, come definita in base all'ipotesi di "risposta a un danno", è una condizione d'infiammazione cronica di basso grado. Persistono pareri discordanti sul fatto che agenti infettivi possano svolgere un ruolo primario sia nell'aterotrombosi sia nella trasformazione di una malattia coronarica stabile in una forma instabile. Nelle lesioni aterosclerotiche umane sono stati identificati *Chlamydia pneumoniae*, citomegalovirus e *Helicobacter pylori*. Inoltre, anticorpi contro le proteine da shock termico della *Chlamydia* possono cross-reagire contro proteine da shock termico prodotte dall'endotelio, portando a un danno endoteliale e ad

aterosclerosi accelerata [79]. Sebbene anticorpi contro Chlamydia, citomegalovirus ed Helicobacter pylori siano riscontrati più frequentemente in pazienti con aterotrombosi piuttosto che nei controlli non è stato documentato un rapporto di casualità. Anticorpi contro questi agenti, dovuti a una precedente infezione, sono stati individuati in un'elevata percentuale della popolazione. Inoltre, numerosi studi randomizzati e controllati non sono riusciti a dimostrare i benefici di un trattamento di lunga durata con l'impiego di antibiotici efficaci contro Chlamydia [80], [81].

La progressione di queste lesioni può essere rallentata, fermata e persino fatta regredire. L'endotelio rappresenta un organo vero e proprio con attività endocrina, autocrina e paracrina. L'inizio e la progressione delle lesioni e degli eventi clinici dell'aterosclerosi sono regolati dallo scambio attivo di messaggi tra vari tipi cellulari. La ridondanza e la molteplicità dei meccanismi di trasmissione di questi segnali suggeriscono un livello di complessità che ostacola interventi terapeutici mirati, ad esempio, su un singolo fattore di crescita o una citochina. D'altro canto la semplice diminuzione dei livelli di lipidi rappresenta un intervento efficace su questi meccanismi, come dimostrato dal fatto che livelli plasmatici elevati di colesterolo e di LDL contribuiscono all'aterosclerosi.

1.4.3 Rigidità arteriosa e funzione endoteliale

Sia la funzione endoteliale che la stiffness arteriosa sono considerate misure surrogate del rischio cardiovascolare e della morbilità futura. Diversi fattori conosciuti compromettono la funzione vasomotoria endoteliale e sono anche associati all'incremento dell'arterial stiffness [82], [83]. Uno studio di Sharon et al [84] mostra che la funzione vasomotoria endotelio dipendente decresca nei soggetti con ipertensione sistolica isolata, confrontati con controlli normotesi, e come la PWV aortica sia associata in modo indipendente alla funzione endoteliale.

Si è confermato che l'ipertensione sistolica isolata è associata a maggiore rigidità aortica indipendentemente dai valori pressori medi e che l'età è, di per sé, associata con il decremento della funzione endoteliale e l'incremento dell'arterial stiffness, anche in individui sani, normotesi. La pulse pressure è spesso considerata un "surrogato" della misurazione della rigidità arteriosa. La risposta all'iperemia reattiva nell'arteria brachiale è significativamente ridotta nei soggetti con ipertensione sistolica isolata rispetto ai controlli sani, normotesi, anziani. Ciò suggerisce che l'ipertensione sistolica isolata è associata a disfunzioni vasomotorie endoteliali. I soggetti giovani ipertesi possono invece presentare funzione endoteliale sia normale che alterata [85]. La risposta reattiva all'iperemia si è mostrata essere inferiore nei soggetti anziani sani rispetto ai più giovani controlli normotesi, confermando da una parte il calo della funzione endoteliale correlato all'età [86], e suggerendo dall'altra che l'ipertensione sistolica isolata potrebbe rappresentare una amplificazione dell'usuale processo di invecchiamento.

Si è inoltre riscontrata una significativa correlazione inversa tra la funzione endoteliale e la PWV aortica, che rimaneva significativa anche dopo la correzione per i potenziali fattori confondenti, tra cui età e pressione arteriosa media. La funzione endoteliale è stata anche inversamente correlata sia con la pulse pressure brachiale che aortica. Tale legame può essere spiegato dal fatto che la rigidità del condotto vascolare è in parte regolata dal tono del muscolo liscio che è sotto l'influenza di numerosi mediatori locali, incluso l'NO e l'endotelina-1.

1.4.4 Fattori in grado di modificare la rigidità arteriosa

Riassumendo possiamo dire che la stiffness delle grandi arterie dipende da tre fattori principali: gli elementi strutturali all'interno della parete arteriosa, come collagene ed elastina, il tono della muscolatura liscia vascolare e le componenti cellulari.

La rigidità vascolare si sviluppa a partire da complesse interazioni tra cambiamenti stabili e dinamici che coinvolgono gli elementi strutturali e cellulari della parete vasale i cui equilibri variano percorrendo l'albero vascolare, risparmiando le arteriole più periferiche sviluppandosi soprattutto nei vasi di conduttanza centrali.

1.4.4.1 Invecchiamento

L'invecchiamento mostra i suoi maggiori effetti sulle strutture non viventi nell'organismo umano come i denti, le articolazioni, il vitreo, e questi effetti risultano più marcati sulle strutture meccaniche, non cellulari dell'organismo. Numerosi studi hanno identificato l'ispessimento vascolare come fattore determinante nel processo di invecchiamento [87], in realtà tale processo è principalmente confinato all'intima [88] mentre la media non si ispessisce nel tempo, al contrario le lamelle di elastina si assottigliano e vengono separate da materiale non portante [89]. Le arterie elastiche vanno dunque incontro principalmente a due cambiamenti delle loro proprietà fisiche: si dilatano e poi si irrigidiscono. Queste modificazioni sono massime in aorta e nelle sue prime diramazioni dove maggiore è la componente elastica [90]. L'aorta e le arterie elastiche si dilatano circa del 10% ad ogni battito nel soggetto giovane e sano, mentre le arterie muscolari solo del 2-3% [91] e questo spiega le diverse conseguenze dell'invecchiamento in queste due parti del sistema arterioso. Applicando alle fibre di elastina le leggi valide per la gomma naturale, è stato calcolato che la rottura di tali fibre si ha dopo 30 anni di cicli di distensione del 10% alla frequenza media di 70 battiti al minuto (la gomma si rompe dopo 8×10^8 cicli di distensione). La frattura delle lamelle elastiche

nell'aorta è infatti proporzionale all'invecchiamento e si può considerare responsabile sia della dilatazione (viene a mancare la componente portante della parete) che dell'irrigidimento (lo stress pulsatorio è trasferito non più a queste componenti elastiche ma al collagene che ha una rigidità maggiore). La minore dilatazione consentita alle arterie muscolari periferiche spiega il loro più lento processo di invecchiamento, confermato da studi istologici che rilevano un grossolano rimaneggiamento della tonaca media nell'aorta prossimale a fronte di piccoli cambiamenti nella costituzione di parete delle arterie periferiche.

L'effetto dell'invecchiamento sulla funzione delle grandi arterie è stato in passato sottostimato facendo riferimento alle modificazioni della pressione brachiale sfigmomanometrica. A livello periferico-brachiale, infatti, per il fenomeno della *amplificazione* la pressione nei giovani è sovrastimata perciò il suo aumento con l'età è parzialmente mascherato. Tra i 20 e gli 80 anni in condizioni fisiologiche la PWV raddoppia (passa da 5 a 12 m/sec) e lo stesso accade per l'impedenza caratteristica del vaso (pressione pulsatoria/flusso pulsatorio in assenza di riflessione) nella aorta prossimale. L'impedenza della aorta ascendente aumenta nello stesso lasso di tempo di almeno 4 volte grazie all'aumento della impedenza caratteristica e al precoce ritorno dell'onda riflessa. Pertanto mentre tra i 20 e gli 80 anni la PAS cresce da 120 a 145mmHg (20%) e la PAD si riduce da 80 a 75 mmHg, la PP brachiale cresce maggiormente ad esempio da 35 a 60 mmHg (70%) ed ancor più si alza la PP aortica da 22 a 65mmHg (200%) [90], [92]. L'aumento della rigidità aortica ed il conseguente anticipo nel ritorno dell'onda riflessa sono quindi due fenomeni associati tra loro nel processo di invecchiamento.

1.4.4.2 Ipertensione

Non è ancora chiaro se le alterazioni della compliance vascolare siano causate dall'ipertensione o se viceversa la perdita di una ottimale funzione arteriosa sia responsabile dell'innalzamento dei valori di pressione. Nella stragrande maggioranza dei casi, infatti, non è possibile identificare una

causa del patologico rialzo dei valori di PA che colpisce circa il 90% dei soggetti di età superiore ai 70 anni, perciò l'ipertensione viene denominata *essenziale* e la sua genesi è attribuita alle interazioni di un insieme di fattori di rischio tra cui hanno un ruolo di spicco proprio l'età e la familiarità (possibilmente coinvolta nella determinazione delle caratteristiche anatomiche del sistema cardiovascolare). L'approccio tradizionale prevede che le complicanze vascolari tipicamente riscontrate negli organi detti "bersaglio" dell'ipertensione (cuore, reni, cervello) siano conseguenza degli elevati valori di PA. Tuttavia, il paradigma dell'elevata pressione del sangue con conseguente vasculopatia continua ad essere oggetto di discussione [93]. È stato dimostrato, infatti, che le alterazioni della struttura e della funzione cardiovascolare in alcuni casi precedono il ritrovamento di un'elevata pressione arteriosa, ad esempio bambini e giovani adulti parenti di ipertesi hanno aumentati spessori del ventricolo sinistro (anche se non si può escludere il ruolo della pressione arteriosa come causa del rimodellamento cardiovascolare negli studi in cui le misurazioni della pressione sono state effettuate solo a riposo o in modo occasionale), inoltre alcuni studi hanno rilevato un alterato rilasciamento diastolico in individui normotesi predisposti per l'ipertensione, la presenza di disfunzione endoteliale come precursore del riscontro di ipertensione, e dell'incremento dell'arterial stiffness in soggetti normotesi predisposti a sviluppare ipertensione. Recentemente è stato riportato che in soggetti con preipertensione, lo spessore miointimale è incrementato nell'arteria carotide comune, se comparato con soggetti che rimangono normotesi.

Nell'Atherosclerosis Risk in Communities analysis i soggetti che si trovavano nel quartile più elevato dei valori di rigidità arteriosa erano predisposti a sviluppare ipertensione. In questo studio 6992 soggetti normotesi (uomini e donne di età dai 45 ai 64 anni), hanno eseguito un Doppler carotideo per valutare l'elasticità arteriosa, e sono stati poi rivalutati a distanza di 3 anni per verificare lo sviluppo di ipertensione (definita come PA > 160/95mmHg o che necessita di terapia farmacologica). Per ogni decremento di 1 SD

nell'elasticità si assisteva a un incremento del 15% di sviluppo di ipertensione. Nell'analisi del Minnesota Children's Blood Pressure Study sono stati seguiti bambini normotesi di età scolare tra i 10 e i 14 anni, dal '77 al '78, e un campione è stato selezionato per valutare l'incidenza dell'ipertensione. Dei 1207 studenti seguiti, a 179 è stata misurata la distensibilità arteriosa tramite una tecnica non invasiva. La pressione arteriosa sistolica era inversamente correlata alla compliance delle grandi arterie prima e dopo l'aggiustamento per i fattori di rischio cardiovascolari (sesso, peso, altezza, insulinoresistenza, iperlipidemia).

Questi reperti non possono essere attribuiti solo all'effetto di stretching dovuto all'aumentata pressione arteriosa, ma devono essere considerati anche come modificazioni adattative strutturali e funzionali intrinseche della parete, in risposta al cronico aumento della pressione o a lesioni primariamente a carico del vaso.

Sono stati effettuati studi su giovani pazienti con ipertensione borderline, valutando la pulse wave velocity (PWV) carotido-femorale e carotido-radiale. I risultati hanno mostrato un aumento della velocità dell'onda di polso nei pazienti con ipertensione borderline rispetto ai controlli sani e significative correlazioni con la pressione arteriosa media.

Questi dati suggeriscono che l'aumento della PWV presente nell'ipertensione borderline non sia dovuto solo all'elevazione della pressione arteriosa, ma rispecchi un danno già presente nelle pareti arteriose.

1.4.4.3 Diabete Mellito

Utilizzando una varietà di tecniche, si è dimostrato che le alterazioni vascolari sono presenti anche in soggetti affetti da diabete mellito. McVeigh et al hanno dimostrato che la compliance vascolare è significativamente ridotta nei soggetti diabetici, indipendentemente dalla presenza o assenza di complicanze fisiche della malattia. Tuttavia, come per gli ipertesi, anche per i soggetti diabetici si pensava che la modificazione vascolare fosse il risultato

dell'aterosclerosi associata. Oxlund et al hanno dimostrato che le alterazioni della compliance arteriosa non sono correlate con il grado di aterosclerosi e che i soggetti diabetici sviluppano alterazioni nel tessuto connettivo arterioso indipendentemente dalla presenza di aterosclerosi. In un'altra analisi, Atherosclerosis Risk in Communities analysis, l'associazione della rigidità arteriosa con l'insulino resistenza è stata valutata in 4701 soggetti prediabetici. I loro risultati suggerivano una associazione tra lo stato prediabetico e l'incremento dell'arterial stiffness ed una assenza di correlazione della rigidità arteriosa con lo spessore della parete del vaso. Giannattasio et al [94] hanno studiato 54 soggetti normoglicemici, normotesi, figli sani di 2 genitori con diabete mellito di tipo 2 e soggetti di età e sesso corrispondenti, come controlli sani. Nei due gruppi non si riportavano differenze nei livelli pressori, glicemici e di emoglobina glicata e anche la sensibilità all'insulina era simile. Tuttavia, nei soggetti con genitori diabetici, la rigidità arteriosa era aumentata. Questo suggerisce che nel diabete le alterazioni delle proprietà meccaniche delle arterie rappresentano un fenomeno precoce che accade in assenza di alterazioni metaboliche o pressorie.

1.4.4.4 Sistema Nervoso Simpatico

Diversi studi hanno mostrato che un aumento puntuale dell'attività del sistema nervoso simpatico è accompagnato da un'immediata riduzione della distensibilità arteriosa. In uno studio condotto da Giannattasio et al [95], si è visto che l'infusione di fenilefrina nell'arteria brachiale si associa ad un'immediata riduzione della distensibilità dell'arteria radiale, valutata dal cambiamento del diametro del vaso, battito dopo battito (tramite il dispositivo Echotracking). Boutouyrie [96] e Perret [97] hanno descritto con una tecnica simile una marcata riduzione della distensibilità arteriosa in risposta al "cold pressure test", manovra utile ad incrementare in modo diffuso l'attività simpatica per via riflessa e tramite meccanismi centrali. Si è poi ulteriormente

notata una riduzione della distensibilità arteriosa nella radiale e nella carotide che avviene durante il fumo di sigaretta, situazione che è accompagnata dall'aumento della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca, provocata dall'effetto stimolatore del sistema simpatico della nicotina e di altri componenti del fumo; ed è dimostrata la sua abolizione secondaria al bloccaggio dei recettori α e β [98]. E' inoltre noto che la stimolazione simpatica incrementa la rigidità arteriosa. L'effetto è ben definito nelle arterie di tipo muscolare come l'arteria radiale, ma sono implicate anche le arterie elastiche, estendendone l'effetto a tutto l'albero arterioso.

L'incremento dell'attività del simpatico agisce sulla distensibilità arteriosa attraverso diversi meccanismi. In primo luogo se l'attività simpatica causa un incremento della pressione arteriosa, la distensibilità si riduce a causa del conseguente aumento del diametro vascolare che stira gli elementi meno distendibili della parete vasale (come il collagene). In secondo luogo la distensibilità potrebbe essere ridotta anche per l'incremento istantaneo della frequenza cardiaca, supponendo che questo incremento sia associato all'irrigidimento delle grandi e medie arterie elastiche che avviene sia nei modelli animali che nell'uomo. Inoltre, altri meccanismi potrebbero essere coinvolti, poiché il simpatico riduce la distensibilità arteriosa anche in assenza dell'incremento della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca. Possiamo speculare che questi meccanismi consistono in una modificazione cronica della struttura della parete arteriosa che ne incrementano la rigidità, come mostrato in studi su animali, comparando la parete dell'arteria carotide innervata o denervata. Altro meccanismo coinvolto è la contrazione della muscolatura liscia vascolare influenzata dal sistema simpatico.

Tutto ciò implica che le malattie caratterizzate dall'incremento dell'attività del simpatico, dovrebbero portare a una riduzione della distensibilità arteriosa.

L'invecchiamento, per esempio, è accompagnato da un progressivo incremento sia dell'attività del simpatico che da una progressiva riduzione della distensibilità arteriosa.

Nell'ipertensione e negli individui anziani la distensibilità arteriosa è ridotta,

mentre l'attività simpatica si ritrova aumentata. La distensibilità arteriosa e l'attività simpatica sono rispettivamente ridotta ed aumentata anche nell'insufficienza renale e nel diabete [99]. Infine una diffusa riduzione della distensibilità arteriosa si verifica nello scompenso cardiaco nel quale l'attività simpatica è molto aumentata e il grado di incremento ha un preciso valore prognostico. Inoltre, interventi terapeutici che indirettamente o direttamente riducono l'attività del simpatico sono accompagnati da un aumento della distensibilità arteriosa.

1.4.4.5 Infiammazione Subclinica

L'infiammazione subclinica ha un ruolo nello sviluppo del processo aterogeno e nel rimodellamento strutturale della matrice della parete vasale nonché nella perdita di funzione dell'endotelio tutti fattori coinvolti nell'irrigidimento della parete vascolare. I valori ematici di PCR sono l'indicatore più comunemente accettato. Così come per l'ipertensione, l'infiammazione subclinica può avere una relazione sia di causa che di effetto nei confronti della stiffness [100].

In alcuni studi condotti su pazienti affetti da arteriti, vasculiti ed artrite reumatoide, in cui è indiscutibile lo stato flogistico cronico, si è osservato un'aumentata PWV rispetto ai controlli sani [101].

La PCR e la stiffness sono intimamente correlate ed è difficile stabilire chi detenga il ruolo promotore dell'intero processo. E' stato proposto che a legare tutti i fattori trattati precedentemente con l'incremento della stiffness sia proprio la PCR, sia in qualità di "marker" di flogosi cronica, sia come "marker" della disfunzione endoteliale alla base dell'irrigidimento vascolare e dell'ipertensione.

Ci sono inoltre condizioni comuni che, indipendentemente, contribuiscono all'incremento di entrambe, come l'obesità, il fumo, la sedentarietà, l'insulinoresistenza, l'ipercolesterolemia, e i farmaci che, come le statine, diminuiscono sia il grado di infiammazione che di PWV. In ogni caso si può

affermare che la PCR costituisce un marcatore di rigidità arteriosa in passato proposto anche nell'uso clinico in aggiunta alla PWV come determinante nella stratificazione del rischio CV e nel monitoraggio terapeutico, tuttavia attualmente dalle ultime linee guida ESH-ESC tale uso non è più indicato [102].

2 SCOPO

Lo scopo del presente studio è quello di determinare gli effetti di due protocolli differenti di terapia antiretrovirale altamente attiva (HAART) sulla funzione e struttura arteriosa in pazienti HIV-positivi naïve, ovvero mai sottoposti in precedenza a terapia antiretrovirale.

A tal fine sono stati studiati 2 differenti gruppi, equiparabili per genere ed età. Un primo gruppo di 19 pazienti HIV positivi è stato posto in terapia antiretrovirale (HAART) con due Inibitori Nucleosidici della Transcriptasi Inversa (NRTI) associati a un Inibitore Non-Nucleosidico della Transcriptasi Inversa (NNRTI), un secondo gruppo di 21 pazienti HIV positivi è stato invece posto in terapia antiretrovirale (HAART) con due Inibitori Nucleosidici della Transcriptasi Inversa (NRTI) a cui è stato associato un Inibitore delle Proteasi (PI). In ogni gruppo sono stati analizzati la distensibilità arteriosa carotidea (Dist), lo spessore miointimale (Intima Media Thickness - IMT), la Pulse Wave Velocity (PWV) e la funzione endoteliale mediante la Flow Mediated Dilatation (FMD) prima di iniziare la terapia antiretrovirale e dopo 6 mesi di terapia.

3 METODI

3.1 RECLUTAMENTO

I soggetti HIV-positivi naïve sono stati reclutati tra quelli seguiti presso l'ambulatorio dell'Unità Operativa di Malattie Infettive dell'A.O. San Gerardo di Monza.

Sono stati valutati complessivamente 40 pazienti HIV-positivi (7 femmine e 33 maschi), con un'età media di 39 anni.

I criteri di inclusione utilizzati sono:

- presenza di infezione da HIV confermata all'ELISA e al Western-Blot;
- età minima di 18 anni;
- assenza di diabete mellito ed ipertensione arteriosa non controllata;
- assenza di terapia antiretrovirale.

I pazienti sieropositivi sono stati poi suddivisi in due gruppi a seconda del tipo di trattamento antiretrovirale che si è deciso di intraprendere.

I fini e i metodi adottati per lo studio sono stati descritti ai pazienti al momento dell'arruolamento e, a seguire, veniva acquisita la firma del consenso informato scritto.

Il presente studio è un sottostudio di protocollo approvato dal C.E. dell'ospedale San Gerardo di Monza e coordinato dall'Unità di Malattie Infettive A.O. San Gerardo, avente come scopo lo studio degli effetti di diversi farmaci HAART sulla struttura e funzione arteriosa.

I pazienti sono stati sottoposti ad analisi ematochimiche complete presso l'ambulatorio di malattie infettive (esame emocromocitometrico, profilo lipidico completo, glicemia, insulinemia, creatininemia, Linfociti T-CD4+ ed HIV-RNA).

Lo studio vascolare consisteva nella valutazione della distensibilità carotidea e valutazione dello spessore miointimale; la pulse Wave velocity; la funzione endoteliale mediante la Flow Mediated Dilatation (FMD).

3.2 PULSE WAVE VELOCITY

L'onda pressoria generata dall'eiezione cardiaca si propaga lungo l'albero vascolare con una velocità che dipende dalle proprietà elastiche del vaso e dalla densità del sangue. Questi elementi sono infatti inseriti nei modelli matematici della PWV, ovvero:

$$\text{Moens-Kortweg} \quad \sqrt{(E \cdot h) / (2 \cdot \rho \cdot R)}$$

$$\text{Bramwell-Hill} \quad \sqrt{(\Delta P \cdot V) / (\Delta V \cdot \rho)}$$

Dove E è il modulo elastico di Young, ρ la viscosità ematica, V il volume, P la pressione, R e h il raggio e lo spessore del vaso.

La PWV carotido-femorale è considerata il gold-standard della rigidità arteriosa in quanto semplice, non invasiva e riproducibile [103].

Viene calcolata a partire dalla registrazione delle onde pressorie delle due arterie tramite tonometria ad appianamento. La differenza di tempo che intercorre tra i piedi delle due onde, rapportata alla distanza tra i punti di misura, permette di calcolare la velocità di scorrimento dell'onda pressoria (*Figura 7*). Valori normali di PWV sono intorno a 9-10 m/sec, tale valore aumenta con l'incremento della stiffness e risente dell'influenza soprattutto dell'età e della pressione arteriosa [104].

Sebbene la relazione tra rigidità aortica ed eventi cardiovascolari sia di tipo continuo, un valore di PWV > 12 m / s è stato suggerito dalle Linee Guida ESH / ESC 2007 come una stima conservativa di alterazioni significative della funzione aortica pazienti ipertesi di mezza età [102]. Un recente consenso di esperti ha rettificato il valore di soglia a 10 m/s [105].

In commercio sono disponibili numerosi sistemi per calcolare la PWV: alcuni permettono la registrazione simultanea delle due onde, mentre altri lo fanno sequenzialmente. In questo studio è stato utilizzato il *Complior System®* (Colson, Les Lilas, Francia). Sulla cute vengono applicati dei meccanotransduttori [106], il tempo di transito è determinato per mezzo di un algoritmo di

correlazione di traduzione simultanea tra ogni onda registrata. L'operatore è in grado di visualizzare la forma dell'onda arteriosa registrata per convalidarla. Tre principali siti arteriosi possono essere valutati, il tronco aortico (carotide-femorale) e a livello superiore (carotide-brachiale) e inferiore (femorale-dorsale del piede). Il sistema è stato usato in diversi studi epidemiologici dimostrando il valore predittivo della PWV per gli eventi CV.

L'onda pressoria può essere registrata sequenzialmente da diversi siti e il tempo di transito può essere calcolato usando anche una registrazione elettrocardiografica.

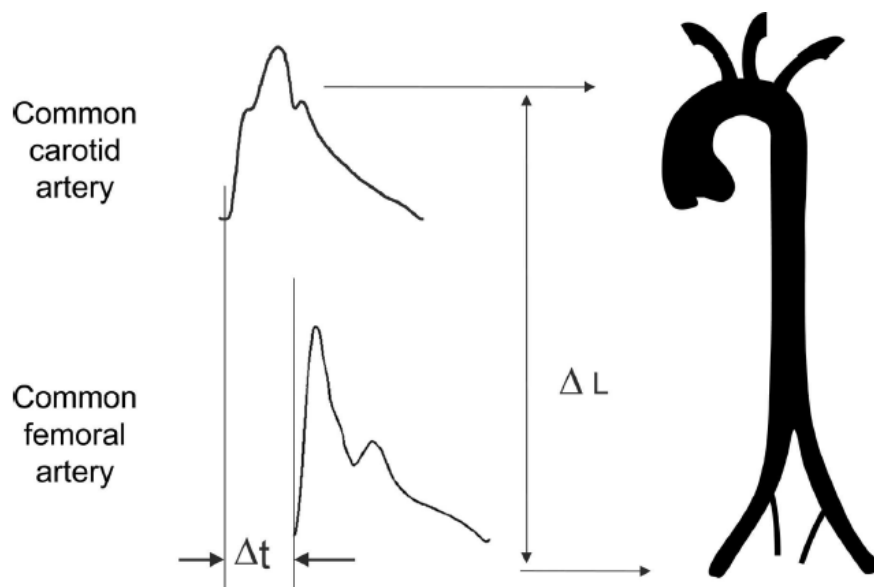


Figura 7 Calcolo della PWV. Tratto da: Laurent S et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. Eur Heart J 2006;27:2588-605.

3.3 DISTENSIBILITÀ CAROTIDEA

La distensibilità di un vaso è definita come la variazione del diametro per un dato aumento di pressione ovvero:

$$\text{Distensibilità} = \frac{\Delta D}{\Delta P \cdot D} \quad [\text{mmHg}^{-1}]$$

Essa è indice inverso di rigidità arteriosa e viene calcolata tramite la formula di Reneman:

$$\text{Distensibilità} = \frac{2\Delta D \cdot \text{Diam} + \Delta D^2}{PP \cdot \text{Diam}^2}$$

Dove ΔD è la differenza sistole-diastole del diametro, Diam è il diametro diastolico e PP è la pressione differenziale.

Le variazioni del diametro vengono misurate tramite sistemi ecografici. Gli apparati di echotracking, una volta localizzato il vaso da parte dell'operatore, effettuano queste misurazioni automaticamente e con una precisione 6-10 volte maggiore rispetto ai comuni sistemi ecografici.

A paziente supino con il collo in leggera estensione e ruotato controlateralmente al lato della misurazione, viene individuata l'arteria carotide comune tramite l'orientamento manuale del trasduttore. La possibile deformazione del vaso determinata dalla pressione della sonda, viene minimizzata con l'uso di un gel conduttore e cercando di evitare l'eccessiva sollecitazione meccanica. Le misurazioni avvengono 2 centimetri sotto la biforcazione carotidea, una volta individuato questo punto vengono impostati manualmente i cursori relativi al centro del vaso e alle sue pareti. Il software calcola automaticamente la distensibilità restituendo serie, di 6 valori ciascuna, delle quali calcola anche la deviazione standard (DS). Per ogni paziente sono state effettuate tre serie di misurazioni mantenendo una DS minore di 50. Le misurazioni sono state effettuate sia in B che in M-mode e per i calcoli è stata utilizzata la media di

tutti i valori ottenuti. Limitazioni sono però rappresentate dalla necessità di esperienza dell'operatore e dalla richiesta di un tempo maggiore rispetto ad altri indici di rigidità arteriosa quali PWV e PWA.

In questo studio è stato utilizzato il sistema di echotracking (Esaote Gold 60®, Esaote, Genova, Italia).

3.4 SPESSORE INTIMO-MEDIALE

L'IMT viene misurato con metodo ultrasonografico a livello dell'arteria carotide comune in questo sito le caratteristiche anatomiche rendono infatti maggiormente riproducibili le misurazioni. È possibile utilizzare sia un metodo di acquisizione classico mediante ecografo, sia sistemi di echotracking che consentono una maggiore precisione. In questo studio il rilevamento dell'IMT è stato eseguito con il medesimo sistema di echotracking utilizzato anche per il rilevamento dei diametri nella misurazione della FMD (Esaote Gold 60®, Esaote, Genova, Italia). Utilizzando una sonda ecografica lineare da 8 MHz viene localizzata manualmente la carotide comune e si imposta il cursore al centro del vaso, dopodiché le misurazioni vengono effettuate, in modo del tutto automatico da parte del software, a circa 2 cm dalla biforcazione carotidea. Per ogni paziente sono state registrate 3 serie da 6 misurazioni ciascuna, mantenendo una deviazione standard inferiore a 50 ed utilizzando la media di tutti i valori acquisiti per l'elaborazione dei calcoli. Valori di spessore intimo-mediale minori di 0.9 mm sono considerati nella norma. Uno spessore intimo-mediale maggiore di 0.9 mm è invece stato riconosciuto come indice di aterosclerosi precoce e correlato ad un incremento del rischio cardiovascolare [107].

3.5 VALUTAZIONE DELLA FUNZIONE ENDOTELIALE

La funzione endoteliale è stata valutata mediante misurazione della Flow Mediated Dilatation (FMD), secondo la tecnica ultrasonografica brevettata da Celermajer et al. [108] nel 1992. Sono stati seguiti tutti gli accorgimenti indispensabili affinché la raccolta dei dati fosse il più precisa ed accurata possibile; a tal fine sono state seguite le linee guida per la misurazione della FMD emanate da Corretti et al. nel 2002 [109].

Ai pazienti è stato richiesto di presentarsi a digiuno e dopo essersi astenuti dal bere caffè/alcolici e dal fumare sigarette nelle 8-12 ore precedenti lo studio della reattività dell'arteria brachiale. Per i soggetti che non erano a digiuno o che avevano fatto uso di sigarette nelle ore precedenti lo studio è stato fissato un nuovo appuntamento.

I pazienti sono stati fatti adagiare in posizione supina in una stanza climatizzata per circa 10 minuti prima di effettuare il test, dopodiché, utilizzando una sonda ecografica lineare da 8 MHz, sono state effettuate sia una misurazione del diametro dell'arteria brachiale sinistra a riposo, sia una misurazione della velocità del flusso arterioso al centro dell'arteria brachiale mediante un segnale doppler ad un angolo compreso tra 40° e 60° rispetto al vaso; il flusso è stato poi calcolato come il prodotto della velocità del flusso per il diametro dell'arteria. Durante ciascun test, tutte le misurazioni sono state attuate nel medesimo punto lungo il decorso dell'arteria brachiale, il quale è stato localizzato pochi centimetri prossimalmente alla fossa antecubitale; ai pazienti è stato pertanto raccomandato di non effettuare alcun movimento per tutta la durata delle misurazioni.

Successivamente un bracciale pneumatico è stato gonfiato a livello della parte distale dell'avambraccio ad una pressione di circa 50 mmHg superiore alla pressione arteriosa sistolica di ciascun soggetto per 4 minuti; questo causa un'ischemia e una conseguente dilatazione delle resistenze arteriose a valle per via dei meccanismi di autoregolazione. È stata pertanto eseguita una seconda registrazione del diametro dell'arteria brachiale nei 30 secondi antecedenti e nei 120 secondi seguenti lo sgonfiamento del bracciale; a questo si

è aggiunta un'ulteriore registrazione della velocità del flusso sanguigno durante i primi 15 secondi dallo sgonfiamento. Lo sgonfiamento del bracciale, infatti, causa un incremento del flusso nell'arteria brachiale misurabile in prima battuta come incremento della velocità, il quale origina un maggior stress di parete che, a sua volta, permette la dilatazione del vaso. Poi è stata lasciata una pausa di 10 minuti affinché il vaso recuperasse le dimensioni originarie e per comprovare ciò è stato effettuato un nuovo monitoraggio ultrasonografico del diametro dell'arteria.

Una volta che le dimensioni del vaso erano tornate quelle originarie, si è proceduto all'ottenimento delle misurazioni per il calcolo della TNG.

A ciascun paziente, è stata somministrata una compressa di nitrati sublinguale (0.3 mg) e circa 3 - 4 minuti dopo, nel periodo di massima dilatazione dovuta appunto all'effetto dei nitrati, è stata effettuata un'ultima misurazione del diametro del vaso e del flusso sanguigno. Tale valutazione consente di ottenere una misura aspecifica di vasodilatazione non endotelio dipendente, dimostrando la capacità di vasorilassamento della parete arteriosa del soggetto [110]. Tutte le misurazioni sono state effettuate da un unico operatore. Le misurazioni dei diametri sono state acquisite automaticamente da un apparato di echotracking il quale, dopo che l'operatore ha individuato il vaso da studiare, ha eseguito in maniera autonoma una serie di acquisizioni con una precisione 6-10 volte superiore ai sistemi ultrasonografici ordinari. Nel nostro studio, come è stato già detto in precedenza, si è fatto uso del sistema di echotracking Esaote Gold 60® (Esaote, Genova, Italia), il quale ha misurato il diametro dell'arteria brachiale a fine diastole dalla linea "m" (linea ipoecogena delimitante il passaggio dall'avventizia alla tonaca media) anteriore a quella posteriore. L'utilizzo di gel conduttore ha minimizzato la deformazione del vaso determinata dalla pressione della sonda. Le acquisizioni dei diametri vasali dopo la liberazione della pressione del bracciale e la somministrazione di nitrati sublinguali sono state espresse come incrementi percentuali rispetto alla misurazione del primo diametro acquisito:

$$\Delta \mathbf{FMD} (\%) = (\emptyset \mathbf{FMD} - \emptyset \mathbf{Basale}) \times 100 / \emptyset \mathbf{Basale}$$

$$\Delta \mathbf{TNG} (\%) = (\emptyset \mathbf{NMD} - \emptyset \mathbf{Basale}) \times 100 / \emptyset \mathbf{Basale}$$

Allo stesso modo gli incrementi dei flussi durante la Flow Mediated Dilatation e dopo la somministrazione di nitrati sono stati espressi come incrementi percentuali rispetto alla misurazione del flusso sanguigno basale:

$$\Delta \Phi \mathbf{FMD} (\%) = (\Phi \mathbf{FMD} - \Phi \mathbf{Basale}) \times 100 / \Phi \mathbf{Basale}$$

$$\Delta \Phi \mathbf{TNG} (\%) = (\Phi \mathbf{TNG} - \Phi \mathbf{Basale}) \times 100 / \Phi \mathbf{Basale}$$

3.6 PROTOCOLLO

A ciascun paziente reclutato è stato chiesto di presentarsi il pomeriggio del giorno prefissato per lo studio presso il reparto di Clinica Medica dell'A.O. S. Gerardo di Monza, a digiuno e previa astinenza da caffeina, fumo ed alcol dal giorno precedente.

Il protocollo è stato ottemperato osservando lo schema seguente:

- Anamnesi: raccolta di dati anagrafici ed antropometrici (peso e altezza), informazioni sull'esistenza di fattori di rischio cardiovascolare e su eventuali terapie ipolipemizzanti o antiipertensive in atto.
- Posizionamento supino del paziente in una stanza climatizzata.
- Misurazione della pressione arteriosa mediante misuratore semiautomatico (3 volte).
- Misurazione della distensibilità carotidea e dell'IMT (Esaote Gold 60®, Esaote, Genova, Italia).
- Misurazione della Pulse Wave Velocity (*Complior System*®, Colson, Les Lilas, Francia)
- Misurazione della funzionalità endoteliale FMD (Esaote Gold 60®, Esaote, Genova, Italia).

Tali valutazioni sono state eseguite una prima volta (T0) quando i pazienti non assumevano ancora la terapia antiretrovirale e poi ripetute dopo 6 mesi di terapia (T1).

3.7 ANALISI STATISTICA

I dati rilevati sono indicati come Media \pm DS. Per l'analisi statistica ci si è avvalsi dell'utilizzo del software SPSS 19®, (SPSS Inc., Chicago, Illinois, U.S.A.), mantenendo un $\alpha= 0.05$.

Per il confronto tra due gruppi si è adottato il *t-test di Student*, mentre si è utilizzato l'*ANOVA-test* per il confronto tra più di due gruppi. Nei confronti multipli, per garantire un adeguato livello di protezione nei confronti dell'errore di Tipo 1, sono stati effettuati confronti *post-hoc* mediante test di Bonferroni.

Per il confronto tra variabili espresse in percentuale si è adottato il test del *chi-quadrato*

.

4 RISULTATI

4.1 CARATTERISTICHE DI POPOLAZIONE

Nella Tabella 3 sono riportate le caratteristiche, i parametri, i fattori di rischio cardiovascolare ed i dati relativi agli esami ematochimici e alla terapia.

I due gruppi (A e B) sono sovrapponibili per quanto riguarda la numerosità (19 vs 21), l'età (38.2 ± 9.4 vs 40.2 ± 9.1) e la percentuale di femmine (15.7% vs 19%).

Anche i parametri inerenti al rischio cardiovascolare non presentano differenze statisticamente significative tra i due gruppi.

In particolare i valori pressori erano nei limiti di norma (PAS 127.3 ± 10.5 vs 131 ± 11.7 ; PAD 75.2 ± 8.3 vs 77.3 ± 10.9) solo 3 pazienti assumevano terapia antipertensiva 1 nel gruppo A e 2 nel gruppo B (5.2% vs 9.5%).

Per quanto riguarda la conta dei linfociti T-CD4 e la quantificazione dell'HIV-RNA anche questi sono risultati sovrapponibili nei due gruppi.

Nei pazienti appartenenti al gruppo A è stata iniziata la terapia antiretrovirale utilizzando 2 farmaci appartenenti alla classe degli Inibitori della Transcrittasi Inversa Nucleosidici (NRTI), in particolare Emtricitabina-Tenofovir in 14 pazienti (74%) e Abacavir-Lamivudina in 5 pazienti (26%) in associazione con 1 Inibitore della Transcrittasi Inversa Non Nucleosidico (NNRTI): Efavirenz in 16 pazienti (85%) e Nevirapina in 3 pazienti (15%).

Nei soggetti appartenenti invece al gruppo B è stata utilizzata l'associazione sempre dei due NRTI sopracitati, Emtricitabina-Tenofovir in 20 pazienti (95%) e Abacavir-Lamivudina in 1 paziente (5%), con un Inibitore delle Proteasi (PI) Atazanavir-Ritonavir in 12 pazienti (57%) e Lopinavir-Ritonavir in 9 pazienti (43%).

	Gruppo A T0	Gruppo B T0	p
Numero	19	21	ns
Età	38.2 ± 9.4	40.2 ± 9.1	ns
Sesso (F)	3 (15.7%)	4 (19%)	ns
PAS (mm Hg)	127.3 ± 10.5	131 ± 11.7	ns
PAD (mm Hg)	75.2 ± 8.3	77.3 ± 10.9	ns
BMI (kg/m ²)	24.2 ± 4.8	25.6 ± 5.8	ns
Fumatori	11 (57%)	9 (42%)	ns
Terapia Antiipertensiva	1 (5.2%)	2 (9.5%)	ns
Terapia Ipolipemizzante	1 (5.2%)	2 (9.5%)	ns
Glicemia (mg/dL)	83.8 ± 7.3	84.6 ± 9.7	ns
Trigliceridi (mg/dL)	117 ± 54	133 ± 52	ns
Coresterolo totale (m/dL)	170.6 ± 43.7	169.8 ± 37.7	ns
LDL (mg/dL)	107.6 ± 42	106 ± 38.5	ns
HDL (mg/dL)	40 ± 11.4	38.6 ± 9.6	ns
CD4 (cell/mm ³)	396 ±76	381 ±144	ns
Nadir CD4 (cell/mm)	338 ±55	295 ±103	ns
HIV-RNA titolo (Log 10 copie/mL)	4.77 ±4.8	5.5 ±6	ns
Undetectable	0(0%)	0(0%)	ns
NRTI	19 (100%)	21 (100%)	ns
Emtricitabina-Tenofovir	14 (74%)	20 (95%)	ns
Abacavir-Lamivudina	5 (26%)	1 (5%)	ns
NNRTI	19 (100%)	0 (0%)	ns
Efavirenz	16 (85%)	-	ns
Nevirapina	3 (15%)	-	ns
PI	0 (0%)	21 (100%)	ns
Atazanavir-Ritonavir		12 (57%)	ns
Lopinavir-Ritonavir		9 (43%)	ns

Tabella 3 Caratteristiche della popolazione.

4.2 MARKER SURROGATI

Nelle seguenti figure (dalla *Figura 8* alla *Figura 11*) si può osservare come a T0 nei due gruppi (A e B) i valori di distensibilità carotidea, spessore miointimale, Pulse Wave Velocity e Flow Mediated Dilatation siano nei limiti di norma e non presentino differenze statisticamente significative.

Dopo 6 mesi di terapia antiretrovirale si è osservato un incremento dei linfociti CD4 e una diminuzione del titolo HIV-RNA sovrapponibile nei 2 gruppi; è stato anche notato un incremento dei valori di colesterolemia totale, LDL e HDL in entrambi i gruppi senza differenze statisticamente significative nè all'interno dello stesso gruppo a T0 e T1 nè tra i due gruppi a T1 (Tabella 4). Non è stato invece evidenziato nessun cambiamento statisticamente significativo per quanto riguarda i parametri di struttura e funzione arteriosa (dalla *Figura 12* alla *Figura 15*).

	Gruppo A T0	Gruppo A T1	p (A T0/T1)	Gruppo B T0	Gruppo B T1	p (B T0/T1)	p (A/B T1)
Numero	19	19	-	21	21	-	-
CD4 (cell/mm)	396 ±76	565 ±125	<0.001	381 ±144		<0.001	ns
Titolo HIV-RNA (Log 10 copie/mL)	4.77±4.8.	1.8 ± 1.77	<0.001	5.5 ± 6	1.94 ± 1.9	<0.001	ns
Undetectable	0 (0%)	13 (68%)	<0.001	0 (0%)	16 (76%)	<0.001	ns
PAS (mm Hg)	127.3 ± 10.5	130.6 ± 12	ns	131 ± 11.7	132.2 ± 15.7	ns	ns
PAD (mm Hg)	75.2 ± 8.3	74.6 ± 9.6	ns	77.3 ± 10.9	77 ±9.6	ns	ns
BMI (Kg/m2)	24..2 ±4.8	24.2±4.6	ns	25.6 ±5.8	25.8 ±5.9	ns	ns
Glicemia (mg/dL)	83.8 ± 7.3	87 ± 12.7	ns	84.6 ± 9.7	86.5 ±12	ns	ns
Trigliceridi (mg/dL)	117 ± 54	143.8 ± 65.5	ns	133 ± 52	166.1± 92.3	ns	ns
Colesterolo totale (m/dL)	170.6 ± 43.7	194 ± 34.6	0.01	169.8 ± 37.7	198.9 ±47.6	0.006	ns
LDL (mg/dL)	107.6 ± 42	122.3 ± 33.6	0.03	106 ± 38.5	119.2 ± 40.4	ns	ns

Tabella 4 Risultati.

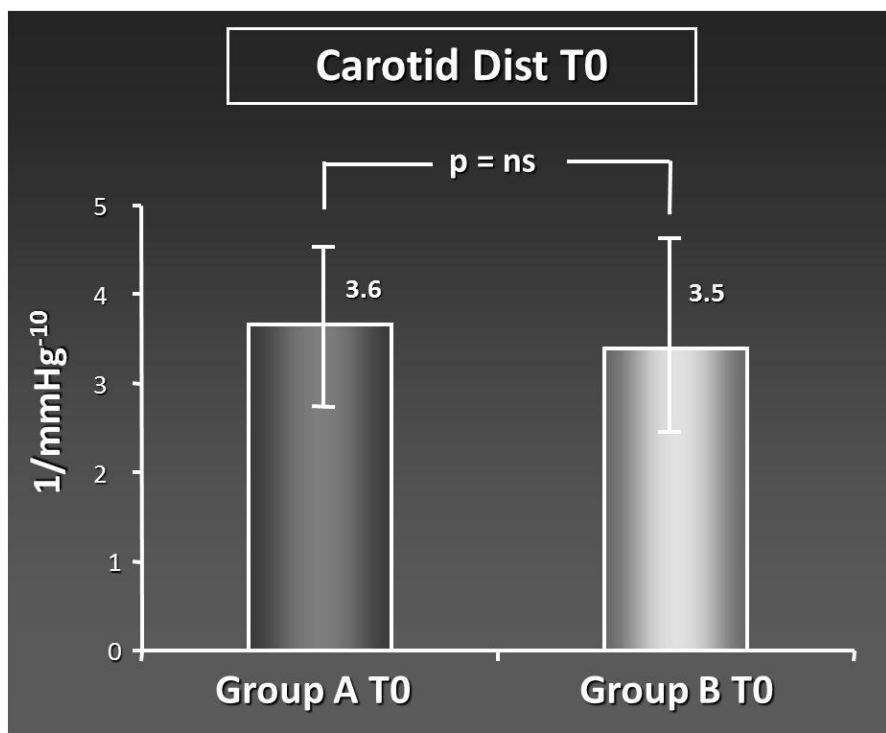


Figura 8 Distensibilità carotidea nei 2 gruppi in studio (A e B) prima di iniziare la terapia antiretrovirale (T0)

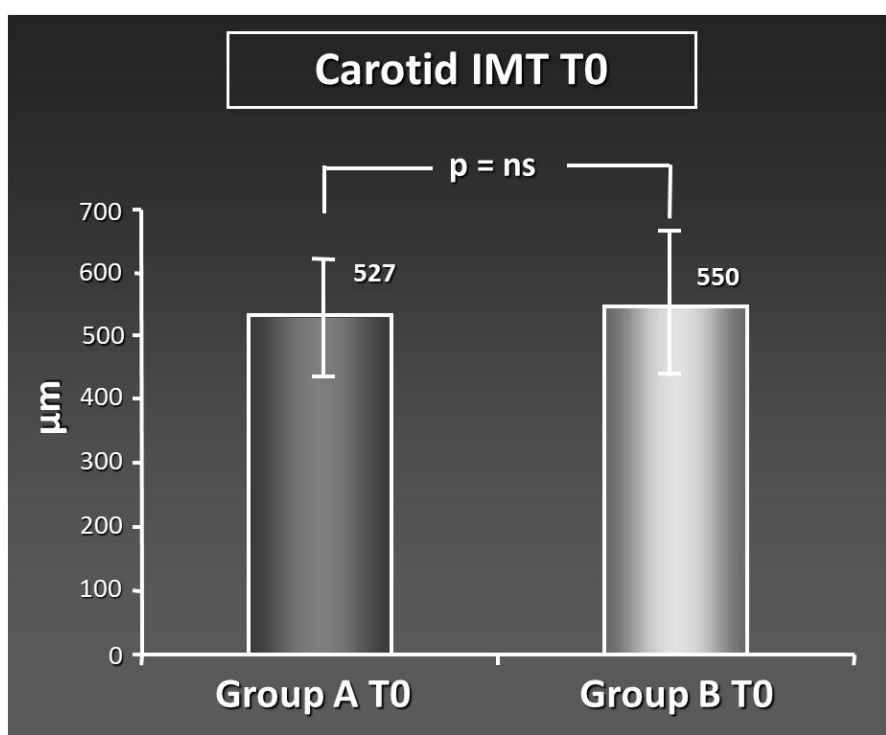


Figura 9 Spessore miointimale carotideo nei 2 gruppi in studio (A e B) prima di iniziare la terapia antiretrovirale (T0).

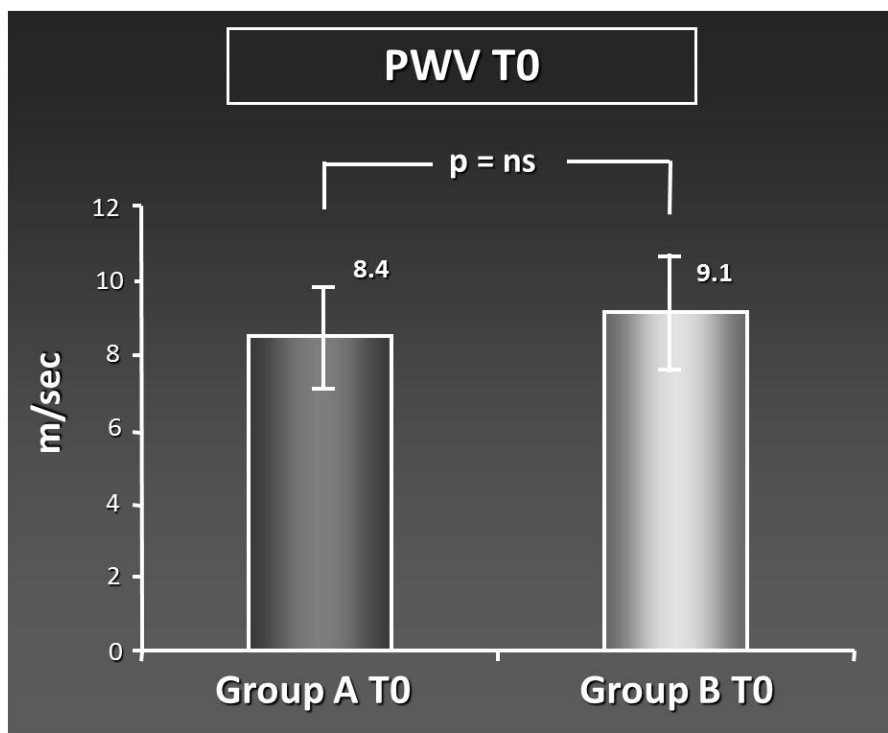


Figura 10 Pulse Wave Velocity nei 2 gruppi in studio (A e B) prima di iniziare la terapia antiretrovirale (T0)

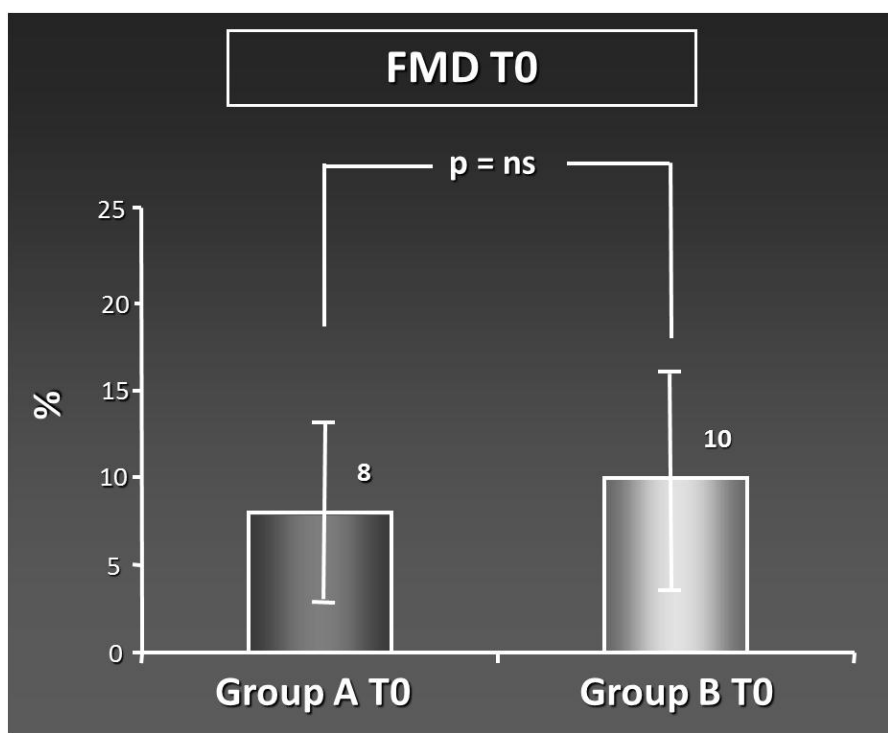


Figura 11 Flow Mediated Dilatation nei 2 gruppi in studio (A e B) prima di iniziare la terapia antiretrovirale (T0)

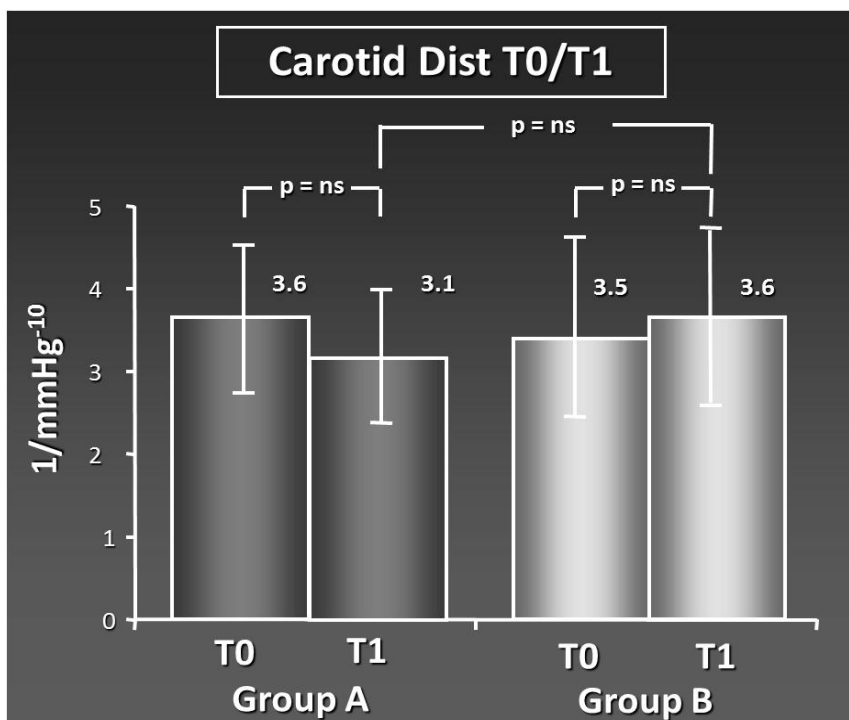


Figura 12 Distensibilità Carotidea nei 2 gruppi in studio (A e B) prima di iniziare la terapia antiretrovirale (T0) e dopo 6 mesi di terapia (T1)

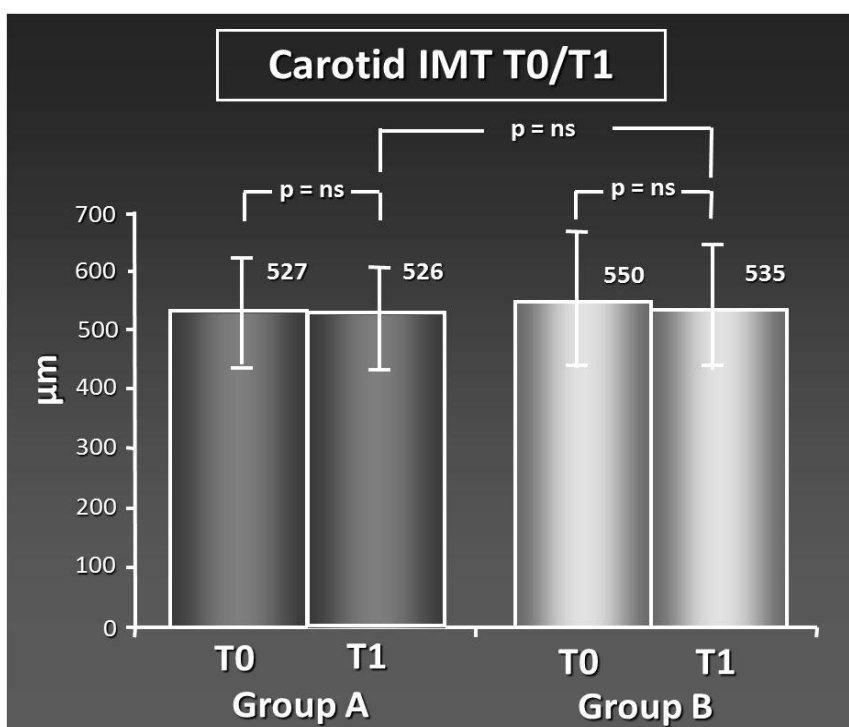


Figura 13 Spessore miointimale carotideo nei 2 gruppi in studio (A e B) prima di iniziare la terapia antiretrovirale (T0) e dopo 6 mesi di terapia (T1)

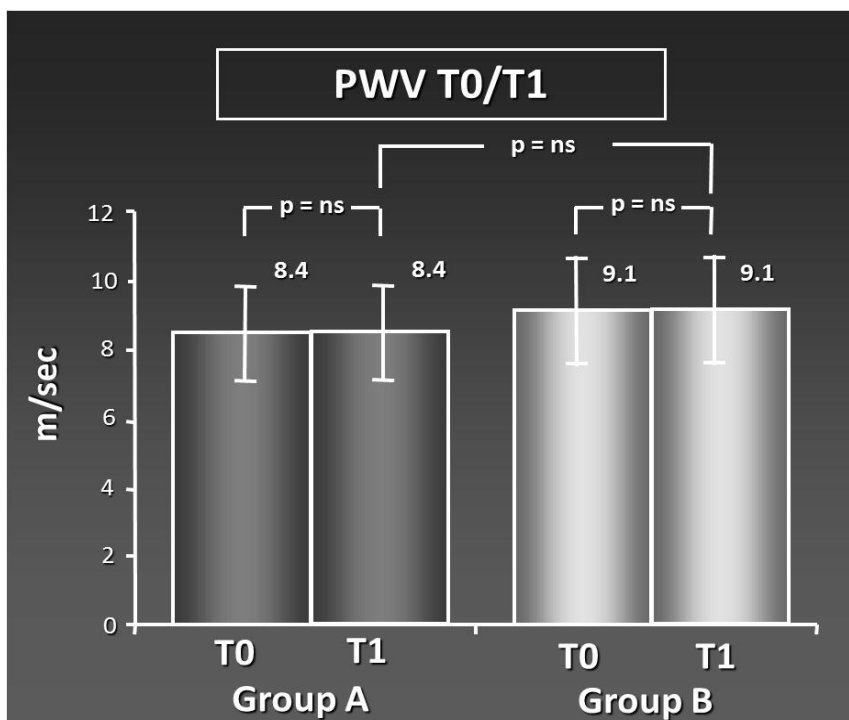


Figura 14 Pulse Wave Velocity nei 2 gruppi in studio (A e B) prima di iniziare la terapia antiretrovirale (T0) e dopo 6 mesi di terapia (T1)

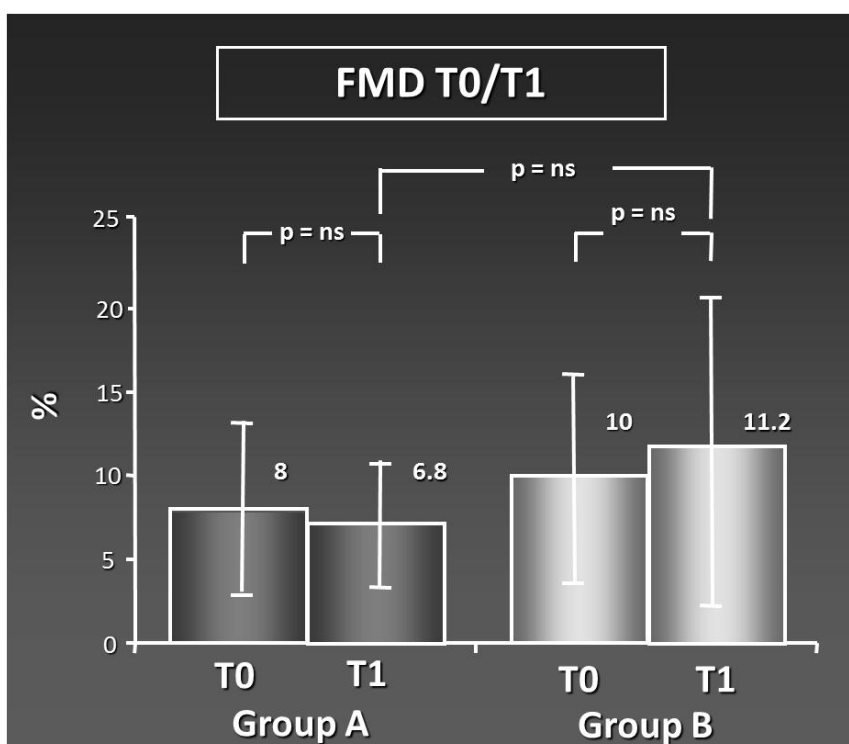


Figura 15 Flow Mediated Dilatation nei 2 gruppi in studio (A e B) prima di iniziare la terapia antiretrovirale (T0) e dopo 6 mesi di terapia (T1)

5 DISCUSSIONE

Nel nostro studio abbiamo arruolato pazienti HIV positivi afferenti agli ambulatori specialistici dell'ospedale San Gerardo di Monza che non avevano ancora intrapreso una terapia antiretrovirale specifica. Tutti i pazienti in seguito a questa valutazione hanno ricevuto indicazioni per il trattamento della malattia in atto, che li ha condotti a migliorare nell'arco di sei mesi il loro stato immunologico. Nella nostra popolazione il trattamento ha, infatti, mostrato un significativo incremento dei linfociti CD4 e una significativa diminuzione dell'HIV RNA in entrambi i gruppi dopo 6 mesi di terapia.

I risultati del nostro studio indicano però che né lo stato infiammatorio cronico dovuto all'infezione da HIV, né i 6 mesi di terapia antiretrovirale sono condizioni in grado di determinare alterazioni funzionali e strutturali arteriose nel periodo da noi studiato.

Sembrerebbe infatti che l'introduzione di terapia antiretrovirale non determini modificazioni significative riguardanti i parametri di struttura e la funzionalità arteriosa considerati dallo studio.

I due differenti regimi terapeutici messi a confronto non paiono avere effetti diversi sui vasi.

Prova diretta di disfunzione endoteliale da correlare a terapia antiretrovirale è stata dimostrata solo per alcuni farmaci, in particolare l'indinavir [111][112][113]. Alcune pubblicazioni hanno invece individuato come alcuni farmaci di ultima generazione (atazanavir, lopinavir/ritonavir, etravirina) non siano in grado di determinare disfunzione endoteliale [114][115][116].

Nel nostro studio nessun paziente è in terapia con indinavir o altri farmaci per i quali sono stati dimostrati effetti tossici sulla funzione endoteliale; circa il 1/4 dei pazienti in terapia utilizza atazanavir, un inibitore delle proteasi di ultima generazione. Infine, circa 1/8 dei pazienti assume abacavir (inibitore nucleosidico della trascrittasi inversa); questo farmaco ha fatto registrare effetti contrastanti sulla funzione endoteliale.

L'unico parametro strutturale che abbiamo preso in considerazione è lo spessore miointimale carotideo (IMT), il quale ha fatto registrare dei valori nel

range di normalità e sovrapponibili nei due gruppi in entrambe le valutazioni (pre e post terapia). Questo parametro ha suscitato molto interesse anche in ambito infettivologico dal momento che si tratta di un marker preclinico di facile ottenimento e dotato di un elevato valore predittivo per eventi cardiovascolari [117].

Nei soggetti affetti da HIV i dati presenti in letteratura hanno evidenziato, a seguito dell'inizio della terapia antiretrovirale, sia incremento [118] che stabilità [119] dello spessore intimo-mediale carotideo.

Uno studio di Currier et al ha pubblicato dati in linea con le nostre osservazioni, suggerendo non solo che né l'infezione da HIV né la terapia antiretrovirale sono necessariamente associati ad aterosclerosi preclinica, ma anche che l'incremento annuale di spessore è sostanzialmente paragonabile a quello della popolazione generale [120].

L'ispessimento miointimale è peraltro un marker tardivo di alterazione arteriosa e si sviluppa dopo numerosi anni di insulti endoteliali; sarebbe pertanto apparso illogico il riscontro di un suo valore alterato in una popolazione in cui non sono state riscontrate alterazioni di markers precoci di disfunzione endoteliale quali, appunto, la flow-mediated dilatation.

Il nostro risultato è in accordo con alcuni studi simili [121],[122],[123],[124], rimane comunque aperta la possibilità che sia necessario un periodo di tempo più lungo perché si determinino alterazioni funzionali e strutturali dei vasi arteriosi.

Ruolo fondamentale in questa direzione potrebbe essere quello delle alterazioni lipidiche che peraltro abbiamo osservato anche nei nostri pazienti.

Come è infatti noto anormalità del quadro lipidico sono state segnalate già in era pre-HAART, confermando l'attitudine dell'infezione nel causare uno stato dislipidemico [125]. Nel corso dell'infezione da HIV si ha un peggioramento del profilo lipidico [126], dovuto a diverse cause tra cui un'aumentata produzione epatica di VLDL e/o ad una ridotta clearance delle stesse.

Tuttora non si è compreso con certezza quale sia il meccanismo che provochi la variazione del profilo lipidico nel paziente sieropositivo. Un'ipotesi accreditata suggerisce che ciò sia dovuto ad un processo di immagazzinamento dei lipidi all'interno dei macrofagi: il virus HIV provocherebbe infatti una disfunzione di ABCA-1 (ATP-binding cassette transporter-1), trasportatore deputato all'uscita di colesterolo dai macrofagi [127]. Inoltre l'HIV stesso provoca variazioni del profilo lipidico individuale.

Inoltre in seguito all'introduzione della terapia antiretrovirale si è assistito all'incremento dei livelli di colesterolo totale, di LDL e di Trigliceridi, soprattutto nei soggetti a cui vengono somministrati PIs [128], anche se ciascun farmaco facente parte di questa famiglia agisce sul profilo lipidico in maniera del tutto singolare.

Tra gli inibitori delle proteasi, il ritonavir è stato oggetto di numerose indagini in quanto in letteratura si ha una forte evidenza del suo effetto sfavorevole sul quadro lipidico. I risultati dello studio D:A:D [129] mostrano come i livelli di trigliceridemia nei pazienti che assumevano ritonavir fossero più elevati che non nei pazienti che utilizzavano altri inibitori delle proteasi. Lo stesso discorso può essere fatto se prendiamo in considerazione i livelli di colesterolo totale: il ritonavir, a dispetto degli altri PIs, ha fatto registrare un incremento dei valori di colesterolemia statisticamente significativo.

Esistono anche evidenze che suggeriscono un effetto di tipo dose/risposta per quel che concerne l'entità dello squilibrio lipemico: l'assunzione di una dose giornaliera maggiore di questo farmaco provoca un maggior incremento dei livelli di trigliceridemia [130]. Il meccanismo secondo cui i PIs influenzano i valori ematici di colesterolo e trigliceridi non sono ancora definiti con certezza; in alcuni studi si ipotizza che i PIs potrebbero prevenire la degradazione proteosomica della Apolipoproteina B, una proteina indispensabile per il rilascio in circolo delle VLDL ricche di trigliceridi da parte delle cellule enteriche ed epatiche, causando un'aumentata secrezione di particelle VLDL [131]. Inoltre il ritonavir sembrerebbe essere in grado di accumulare lipidi all'interno

degli epatociti, il che causerebbe, di nuovo, una iperproduzione di VLDL [132].

A differenza del ritonavir e degli altri PIs, l'atazanavir, un inibitore delle proteasi messo in commercio più recentemente, sembra avere un effetto sulla lipemia meno pronunciato, anzi sembrerebbe essere associato ad una diminuzione del livello di colesterolo totale e trigliceridi in pazienti affetti da dislipidemia severa [133].

Effetti sulla lipemia simili a quelli esercitati dai PIs sono stati registrati anche nella famiglia degli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTIs); in particolare diversi studi hanno analizzato gli effetti della stavudina: questo farmaco si è dimostrato responsabile di un netto incremento nei livelli di trigliceridemia anche se confrontato con altri NRTIs [134]. Alterazioni nel quadro lipemico sono da imputarsi alla nota tossicità sui mitocondri dovuta all'inibizione della polimerasi- γ , enzima indispensabile per la replicazione del mitocondrio; una sua inibizione provoca infatti un deficit energetico di ATP cellulare con decremento nella sintesi di lipidi intracellulari e pirimidine [135]. Conseguenze plausibili di queste proprietà dei NRTIs sono l'esacerbazione della lipoatrofia (decremento dei lipidi intracellulari ed apoptosi) e l'insulinoresistenza (ridotta sensibilità all'insulina dovuta ad elevati livelli di lipidi circolanti).

Infine, per quel che concerne gli inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTIs), occorre segnalare la loro associazione ad incrementi nei valori di colesterolemia totale, di LDL, di trigliceridi ma anche di HDL, soprattutto nei pazienti sottoposti a terapia con nevirapina [136]. Spiegazioni plausibili di questi effetti metabolici fanno capo all'aumentata produzione di Apolipoproteina A-I, con conseguente incremento di HDL, ed all'attivazione delle SREBP (così come per i PIs) con conseguente ipertrigliceridemia.

Il nostro studio presenta alcune limitazioni relative alla numerosità della popolazione studiata (anche a causa della difficoltà nel reperire soggetti con le caratteristiche richieste) e alla durata (sei mesi potrebbero essere un periodo breve per evidenziare modificazioni significative per quanto riguarda i parametri funzionali e strutturali dei vasi arteriosi).

Sarebbe quindi interessante poter valutare in un periodo maggiore eventuali modificazioni arteriose e poter aumentare la casistica dello studio.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] Montagnier L et al. Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. *Princess Takamatsu Symp* 1984;15:319-31.
- [2] UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013
- [3] Scheneider MF et al. Patterns of the hazard of death after AIDS through the evolution of antiretroviral therapy: 1984-2004. *AIDS* 2005;19:2009-18.
- [4] Jain MK et al. Changes in mortality related to human immunodeficiency virus infection: comparative analysis of inpatient deaths in 1995 and in 1999-2000. *Clin Infect Dis*, 2003;36:1030-8.
- [5] Palella FJ et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *NEJM* 1998;13:853-60.
- [6] Crum NF et al. Comparison of Cause of Death and Mortality Rates Among HIV-Infected Person. *J Acquir Defic Syndr* 2006;41:194-200.
- [7] Aberg J. Cardiovascular complications in HIV management: past, present, and future. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009;50:54–64.
- [8] World Health Organization (2003). "Scaling up retroviral therapy in resource limited settings". Retrieved 2006-01-17.
- [9] Lichtenstein K et al. Analysis of cardiovascular risk factors in the HIV outpatient study cohort. Presented at: 13th CROI; Denver, 2006. Abstract.
- [10] Saves M et al. Risk factors for coronary heart disease in patients treated for human immunodeficiency compared with the general population. *Clinical Infection Disease* 2003;37:292-8.
- [11] Hirschfield GM, Pepys MB. C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *QJM*. 2003;96:793– 807.
- [12] Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer H-G, Loewel H, Doering A, Hutchinson WL, Pepys MB. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 1999; 99:237–42.
- [13] Triant, VA, Meigs, JB, Grinspoon, SK. Association of C-reactive protein and HIV infection with acute myocardial infarction. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 51:268.
- [14] Blann, AD, Seigneur, M, Constans, J, et al. Soluble P-selectin, thrombocytopenia and von Willebrand factor in HIV infected patients. *Thromb Haemost* 1997; 77:1221 (ABSTRACT)

- [15] Karmochkine, M, Ankri, A, Calvez, V, et al. Plasma hypercoagulability is correlated to plasma HIV load. *Thromb Haemost* 1998; 80:208. (ABSTRACT)
- [16] Kuller, LH, Tracy, R, Bellosso, W, et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med* 2008; 5:e203
- [17] Phillips A et al. Interruption of ART and risk of cardiovascular disease in persons with HIV-1 infection: exploratory analyses from the SMART trial. *Antivir Ther* 2008;13:177-87.
- [18] El-Sadr WM et al. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med* 2006;355:2283-96.
- [19] Ananworanich J et al. CD4-guided scheduled treatment interruptions compared with continuous therapy for patients infected with HIV-1: results of the STACCATO randomised trial. *Lancet* 2006;368:459-65.
- [20] Calmy et al. HIV activates markers of cardiovascular risk in a randomized treatment interruption trial: STACCATO. Presented at: 15th CROI; Boston, 2008. Abstract.
- [21] Kaplan, RC, Kingsley, LA, Gange, SJ, et al. Low CD4+ T-cell count as a major atherosclerosis risk factor in HIV-infected women and men. *AIDS* 2008; 22:1615.
- [22] Oliviero U, Bonadies G, Apuzzi V, Foggia M, Bosso G, Nappa S, et al. Human immunodeficiency virus per se exerts atherogenic effects. *Atherosclerosis* 2009;204:586-589.
- [23] Torre D. Nitric oxide and endothelial dysfunction in HIV type 1 infection. *Clin Infect Dis* 2006; 43(8): 1086-7.
- [24] Chi D, Henry J, Kelley J, Thorpe R, Smith JK, Krishnaswamy G. The effects of HIV infection on endothelial function. *Endothelium* 2000; 7(4): 223-42. (ABSTRACT)
- [25] Schechter AD, Berman AB, Yi L, et al. HIV envelope gp120 activates human arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(18): 10142-7
- [26] Wolf K, Tsakiris DA, Weber R, Erb P, Battegay M. Antiretroviral therapy reduces markers of endothelial and coagulation activation in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2002; 185(4): 456-62.
- [27] Grunfeld C et al. Hypertriglyceridemia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1989;86:27-31.
- [28] Phillips A et al. Interruption of ART and risk of cardiovascular disease in persons with HIV-1 infection: exploratory analyses from the SMART trial. *Antivir Ther* 2008;13:177-87.

- [29] Esper R J et al. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Card Diab* 2006; 5:4.
- [30] D:A:D Study Group. Combination Antiretroviral Therapy and the Risk of Myocardial Infarction. *NEJM* 2003;349 (21):1993-2003.
- [31] D:A:D Study Group. 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;371(9622):1417-26.
- [32] D:A:D Study Group. 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. *JID* 2010;201:318-30.
- [33] The SMART/INSIGHT and the D:A:D study group. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients. *AIDS* 2008;22(14):F17-F24.
- [34] Vaughn G et al. Protease inhibitors and cardiovascular disease: analysis of the Los Angeles County adult spectrum of disease cohort. *AIDS Care* 2007;19:492-99.
- [35] Rickerts V et al. Incidence of myocardial infarctions in HIV-infected patients between 1983 and 1998: the Frankfurt HIV-cohort study. *Eur J Med Res* 2000;5:329-33.
- [36] Mary-Krause M et al. Impact of treatment with protease inhibitor on myocardial infarction occurrence in HIV infected men. *AIDS* 2003;17(17):2479-86.
- [37] Bozzette SA et al. Cardiovascular and Cerebrovascular Events in Patients Treated for Human Immunodeficiency Virus Infection. *NEJM* 2003;348:702-10.
- [38] Lichtenstein K et al. Analysis of cardiovascular risk factors in the HIV outpatient study cohort. Presented at: 13th CROI; Denver, 2006. Abstract.
- [39] Klein D et al. Do Protease Inhibitors Increase the Risk for Coronary Heart Disease in Patients With HIV-1 Infection? *J Acquired Immune Deficiency Syndrom* 2002;30:471-7. 64.
- [40] El-Sadr WM et al. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med* 2006;355:2283-96.
- [41] Gulick R. New HIV drug and formulations: effect on therapeutic paradigm. *CROI 2013 Oral Lecture*.
- [42] Gathe J, Cade J, DeJesus E, et al. Week-24 Primary Analysis of Cenicriviroc vs Efavirenz, in Combination with Emtricitabine/ Tenofovir, in Treatment-naïve HIV-1+ Adults with CCR5-tropic Virus. *CROI 2013 Paper #106LB*.

- [43] Anderson M, Gilmartin J, Robberechts M, et al. Safety and Antiviral Activity of MK-1439, a Novel NNRTI, in Treatment-naïve HIV+ Patients. *CROI 2013 Paper #100*.
- [44] Lundgren JD EACS guidelines on the prevention and management of metabolic diseases in HIV. *HIV Medicine* 2008; 9:72-81.
- [45] Malik S et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease and all causes in the United States adults. *Circulation* 2004;110:1245- 50.
- [46] Van Wijk et al. Functional and Structural Markers of Atherosclerosis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *JACC* 2006;47(6):1117-23.
- [47] Bonfanti P et al. HIV and metabolic syndrome. A comparison with general population. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45(4):426-31.
- [48] Sekar V et al. Pharmacokinetic drug-drug interaction between the new HIV protease inhibitor darunavir (TMC114) and the lipid-lowering agent pravastatin. Presented at: 8th International Workshop in Pharmacology of HIV Therapy; Budapest, Hungary, 2007 Abstract.
- [49] Fichtenbaum CJ et al. Changes in markers of atherogenic dyslipidemia, inflammation and platelet activation with treatment with pravastatin, fenofibrate or the combination: results from ACTG A5087. Presented at: 15th CROI; Boston, 2008. Abstract.
- [50] Calza L et al. Substitution of nevirapine or efavirenz for protease inhibitor versus lipidlowering therapy for the management of dyslipidemia. *AIDS* 2005;19:1051-58.
- [51] Van der Valk et al. Effect of interventions to improve dyslipidemia. Presented at: 8th International Congress on Drug Therapy in HIV infection: Glasgow, UK, 2006. Abstract.
- [52] Dubè MP et al. Guidelines for the evaluation and management of dyslipidemia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults receiving antiretroviral therapy: recommendation of the HIV Medical Association of the IDSA and ACTG. *Clin Infect Dis* 2003;37:613-27.
- [53] De Wit S et al. Incidence and risk factor for new-onset diabetes in HIV-infected patients. *Diabetes Care* 2008;31(6):1224-9.
- [54] Worm AW et al. Diabetes Mellitus, Preexisting Coronary Heart Disease, and the Risk of Subsequent Coronary heart disease Events in Patients Infected With Human Immunodeficiency Virus: The Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (D:A:D Study). *Circulation* 2009;119:805-11.

- [55] Drechsler H et al. Switching effective antiretroviral therapy: a review. *Clin Infect Dis* 2002;39:557-61.
- [56] Tebas P. Insulin resistance and diabetes mellitus associated with antiretroviral use in HIV-infected patients: pathogenesis, prevention and treatment options. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;49(2):S86-S92.
- [57] Carr A et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS* 1998;12:F51-7.
- [58] Bedimo RJ Body-Fat abnormalities in Patients With HIV: Progress and Challenger. *AIDS care* 2008;7(6):292-305.
- [59] Rietschel P et al. Assessment of growth hormone dynamics in human immunodeficiency virus-related lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:504-10.
- [60] Barbaro G et al. Cardiovascular complications in the acquired immunodeficiency syndrome. *Rev Assoc Med Bras* 2009;55(5):621-30.
- [61] Nagy GS et al. Human immunodeficiency virus type 1-related lipoatrophy and lipohypertrophy are associated with serum concentration of leptin. *Clin Infect Dis* 2003;36:795-802.
- [62] Fliers E et al. HIV-associated adipose redistribution syndrome as a selective autonomic neuropathy. *Lancet* 2003;362:1758-60.
- [63] Martin A et al. Reversibility of lipoatrophy in HIV infected patients 2 years after switching from a thymidine analogue to abacavir: the MITOX Extension Study. *AIDS* 2004;18:1029-36.
- [64] Tebas P et al. Switching to a protease inhibitors-containing, nucleoside-sparing regimen (lopinavir/ritonavir plus efavirenz) increase limb fat but raises serum lipid levels: results of a prospective randomized trial (AIDS clinical trial group 5125s). *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45:193-200.
- [65] Murphy R et al. Peripheral and visceral fat changes following a treatment switch to a nonthymidine analog or nucleoside-sparing regimen in patients with peripheral lipoatrophy: 48 week final result of ACTG A5110, a prospective, randomized, multicenter clinical trial. *J Antimicrob Chemother* 2009;63(5):998-1005.
- [66] Diehl LA et al. Metformin increases HDL-cholesterol and decreases subcutaneous truncal fat in nondiabetic patients with HIV-associated lipodystrophy. *AIDS Patient Care STDS* 2008;22(10):779-86.
- [67] Mulligan K et al. Effects of metformin and rosiglitazone in HIV-infected patients with hyperinsulinemia and elevated waist/hip ratio. *AIDS* 2007;21(1):47-57.

- [68] Mallon PW et al. Effect of pravastatin on body composition and markers of cardiovascular disease in HIV-infected men: a randomized, placebo-controlled study. *AIDS* 2006;20(7):1003-10.
- [69] Gazzaruso C et al. Hypertension among HIV patients: prevalence and relationships to insulin resistance and metabolic syndrome. *J Hyperten* 2003;21(7):1377-82.
- [70] Seaberg et al. Association between highly active antiretroviral therapy and hypertension in a large cohort of men followed from 1984 to 2003. *AIDS* 2005;19:953-60.
- [71] Crane HM et al. Antiretroviral medication associated with elevated blood pressure among patients receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2006;20:1019-26.
- [72] Feigenbaum K e Longstaff L. Management of the metabolic syndrome in patients with human immunodeficiency virus. *The diabetes educator* 2010;20(10):1-8.
- [73] Michael F O'Rourke, Michel E Safar and Victor Dzau. The Cardiovascular Continuum extended: Aging effects on the aorta and microvasculature. *Vasc Med* 2010 15: 461-468.
- [74] Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I. Evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 937-954.
- [75] Libby P. Molecular bases of acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91: 2844-2850.
- [76] Kolodgie FD, Virmani R, Burke AP, et al. Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque. *Heart* 2004; 90: 1385-1391.
- [77] Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis* 2002; 44: 349-356.
- [78] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
- [79] Mayr M, Metzler B, Kiechl S, et al. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1560-1566.
- [80] Andraws R, Berger JS, Brown DL. Effects of antibiotic therapy on outcomes of patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2005; 293: 2641-2647.

- [81] Grayson JT, Kronmal RA, Jackson LA, et al. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events. *N Engl J Med* 2005; 352:1637-1645.
- [82] Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women.
- [83] McEniery CM, Yasmin, Hall IR, Qasem A, Wilkinson IB, Cockcroft JR. Normal vascular aging: differential effects on wave reflection and aortic pulse wave velocity: the Anglo-Cardiff Collaborative Trial (ACCT). *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1753–1760.
- [84] Sharon ML, Wallace, Yasmine, Carmel M, McEniery, Kaisa M, Cockcroft, Ian B Wilkinson: Isolated systolic hyper tensions characterized by increased aortic stiffness and endothelial dysfunction. *Hypertension* 2007; 50: 228-233.
- [85] Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Benjamin N, Ritter JM. Preserved endothelium- dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1994;330:1036 –1040.
- [86] Lind L. Systolic and diastolic hypertension impair endothelial vasodilatory function in different types of vessels in the elderly: the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. *J Hypertens*. 2006;24:1319 –1327.
- [87] Nagai Y, Metter EJ, Earley CJ, et al. Increased carotid artery intimal-medial thickness in asymptomatic older subjects with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation* 1998;98:1504 –9.
- [88] Virmani R, Avolio AP, Mergner WJ, et al. Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. *Am J Pathol* 1991;139:1119-29.
- [89] Avolio AP, Lauren PD, Yong J, O'Rourke MF. Structural and morphological changes in aging and human thoracic aorta. *Aust NZ Med* 1986;16:567.
- [90] Nichols WW, O'Rourke MF. McDonald's blood flow in arteries. Theoretical, Experimental and Clinical Principles. 5th ed. Oxford University Press; 2005.
- [91] Franklin SS, Gustin W, Wong ND, et al. Hemodynamic patterns of age-related change in blood pressure. *Circulation* 1997;96; 308 –15.
- [92] O'Rourke MF, Hashimoto J. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1–13.
- [93] Stephen P, Glasser and Donna K. Arnett. Vascular Stiffness and the "Chicken-or-the-Egg" Question. *Hypertension* 2008;51;177-178.

- [94] Giannattasio C, Failla M, Capra A, Scanziani E, Amigoni M, Boffi L, Whistock C, Gamba P, Paleari F, Mancia G. Increased arterial stiffness in normoglycemic normotensive offspring of type 2 diabetic parents. *Hypertension*. 2008;51:182–187.
- [95] Choi CU, Park EB, Suh SY, Kim JW et al: Impact of Aortic Stiffness on cardiovascular disease in patient with chest pain. *Am J Hypertens* 2007; 20:1163-1169.
- [96] Boutouyrie P, Lacolley P, Girerd X, Beck L, Safar M, Laurent S. Sympathetic activation decreases medium-sized arterial compliance in humans. *Heart Circ Physiol* 1994; 36: H1368-H1376.
- [97] Perret F, Mooser V, Tardy Y, Meister JJ, Mooser E, et al. Effect of cold pressor test on internal diameter of the radial artery. *Am J Hypertens* 1989; 2:727-728.
- [98] Failla M, Grappiolo A, Cargo S, Calchera I, Giannattasio C, Mancia G. Effects of cigarette smoking on carotid and radial artery distensibility. *J Hypertens* 1997;15:1659-1664.
- [99] Randall OS, Esler MD, Bulloch EG, Maisel AS, Ellis CN, Zweifler AJ, et al. Relationship of age and blood pressure to baroflex sensitivity and arterial compliance in man. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1976;3:357s-360ss.
- [100] Nagano M, Nakamura M, Sato K, Tanaka F, Segawa T, Hiramori K Association between serum C-Reactive Protein levels and Pulse Wave Velocity: a population-based cross-sectional study in a general population *Atherosclerosis* 2005; 180:189-195.
- [101] Kampus P, Muda P, Kals J, Ristimae T, Fischer K, Teesalu R, Zilmer M The relationship between inflammation and arterial stiffness in patients with essential hypertension *International Journal of Cardiology* 2006; 112:46-51.
- [102] Mancia G and The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Journal of Hypertension* 2007, 25:1105–1187.
- [103] Laurent S et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006;27:2588-605.
- [104] Cecelja M, Chowienczyk P. Dissociation of aortic pulse wave velocity with risk factors for cardiovascular disease other than hypertension: a systematic review. *Hypertension* 2009;54:1328-1336.
- [105] Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, et al. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens* 2012; 30:445–448.

- [106] Asmar R, Benetos A, Topouchian J, Laurent P, Pannier B, Brisac AM, Target R, Levy B. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension* 1995;26:485–490.
- [107] Lorenz MW et al. Prediction of Clinical Cardiovascular Events With Carotid Intima-Media Thickness: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation* 2007;115:459-67.
- [108] Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340:1111–5.
- [109] Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39: 257–265.
- [110] Deanfield J, Donald A, Ferr C, Giannatasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancia G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S, and Webb DJ. Endothelial function and dysfunction. Part I. Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the working group on endothelin and endothelial factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 23: 7–17, 2005.
- [111] Shankar, SS, Dubé, MP, Gorski, JC, et al. Indinavir impairs endothelial function in healthy HIV-negative men. *Am Heart J* 2005; 150:933.
- [112] Jiang B, Hebert VY, Zavec JH, Dugas TR. Antiretrovirals induce direct endothelial dysfunction in vivo. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;42:391-5
- [113] Dubé MP, Gorski JC, Shen C. Severe impairment of endothelial function with the HIV-1 protease inhibitor indinavir is not mediated by insulin resistance in healthy subjects. *Cardiovasc Toxicol.* 2008;8:15–22.
- [114] Dubé MP, Shen C, Greenwald M, Mather KJ. No impairment of endothelial function or insulin sensitivity with 4 weeks of the HIV protease inhibitors atazanavir or lopinavir-ritonavir in healthy subjects without HIV infection: a placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* 2008; 47(4):567–574.
- [115] Grubb JR, Dejam A, Voell J, et al. Lopinavir-ritonavir: effects on endothelial cell function in healthy subjects. *J Infect Dis* 2006;193:1516–1519.
- [116] Gupta SK, Mi D, Liu Z, Saha C. Endothelial, Inflammatory, Coagulation, Metabolic Effects and safety of Etravirine in HIVUninfected Volunteers AIDS Patient Care STDS. 2011 Jun;25(6):327-31. Epub 2011 Apr 6.

- [117] Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness. A systematic review and meta-analyses. *Circulation*.2007;115:459–467.
- [118] Hsue et al. Rapid Progression of Atherosclerosis at the Carotid Bifurcation Is Linked to Inflammation in HIV-infected Patients. Presented at: 17th CROI; San Francisco, 2010. Abstract 125.
- [119] Mercié P et al. Carotid intima-media thickness is slightly increased over time in HIV-1-infected patients. *HIV medicine* 2005; 6:380-7.
- [120] Currier JS et al. Progression of carotid artery intima-media thickening in HIV-infected and uninfected adults. *AIDS* 2007;21:1137-45.
- [121] Lebech AM, Kristoffersen US, Wiinberg N, Konfoed K, Andersen O; Hesse B, Petersen CL, Gerstoff J, Kjaer A. Coronary and peripheral endothelial function in HIV patients studied with positron emission tomography and flow-mediated dilation: relation to hypercholesterolemia. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008 Nov; 35(11):2049-58.
- [122] Torriani, FJ, Komarow, L, Parker, RA, et al. Endothelial function in human immunodeficiency virus-infected antiretroviralnaive subjects before and after starting potent antiretroviral therapy: The ACTG (AIDS Clinical Trials Group) Study 5152s. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:569.
- [123] Nolan D, Watts GF, Herrmann SE, French MA, John M, Mallal S. Endothelial function in HIVinfected patients receiving protease inhibitor therapy: does immune competence affect cardiovascular risk? *QJM* 2003;96:825–832.
- [124] Dubé MP, Shen C, Mather KJ, Waltz J, Greenwald M, Gupta SK. Relationship of body composition, metabolic status, antiretroviral use, and HIV disease factors to endothelial dysfunction in HIV-infected subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010 Aug;26(8):847-54.
- [125] Shor-Posner, G, Basit, A, Lu, Y, et al. Hypocholesterolemia is associated with immune dysfunction in early human immunodeficiency virus-1 infection. *Am J Med* 1993; 94:515.
- [126] Grunfeld, C, Pang, M, Doerrler, W, et al. Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:1045. (ABSTRACT).
- [127] Mujawar, Z, Rose, H, Morrow, MP, et al. Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. *PLoS Biol* 2006; 4:e365.
- [128] Behrens G, Dejam A, Schmidt H, Balks HJ, Brabant G, Korner T, et al. Impaired glucose tolerance, beta cell function and lipid metabolism in HIV patients under treatment with protease inhibitors. *AIDS* 1999; 13:F63–F70.

- [129] DAD Study Group, Friis-Møller, N, Reiss, P, et al. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2007; 356:1723.
- [130] Boffito, M, Collot-Teixeira, S, Gazzard, B, et al. Plasma Exposure of 100 mg Once and Twice Daily Decreases HDL and CD36 Expression but Only twice-daily Dosing Increases Triglycerides: Potential Effect of RTV on cardiovascular Disease. Presented at the 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA, February 3-6, 2008; (ABSTRACT).
- [131] Kamin DS, Grinspoon SK. Cardiovascular disease in HIV-positive patients. *AIDS* 2005; 19:641–52.
- [132] Riddle TM, Kuhel DG, Woollett LA, Fichtenbaum CJ, Hui DY. HIV protease inhibitor induces fatty acid and sterol biosynthesis in liver and adipose tissues due to the accumulation of activated sterol regulatory element-binding proteins in the nucleus. *J Biol Chem* 2001; 276:37514– 37519.
- [133] Möbius, U, Lubach-Ruitman, M, Castro-Frenzel, B, et al. Switching to atazanavir improves metabolic disorders in antiretroviral-experienced patients with severe hyperlipidemia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 39:174.
- [134] Galli, M, Ridolfo, AL, Adorni, F, et al. Body habitus changes and metabolic alterations in protease inhibitor-naive HIV-1- infected patients treated with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29:21.
- [135] McComsey GA et al. Role of mitochondria in HIV lipoatrophy: insight into pathogenesis and potential therapies. *Mitochondrion* 2004;4:111-8.
- [136] Fontas, E, van Leth, F, Sabin, CA, et al. Lipid profiles in HIV-infected patients receiving combination antiretroviral therapy: are different antiretroviral drugs associated with different lipid profiles? *J Infect Dis* 2004; 189:1056.