

Università degli Studi di Milano



Scuola di Dottorato in Medicina Clinica e Sperimentale

Dipartimento di Scienze della Salute

XXX Ciclo

**Il ruolo del pathway SOCS-1/TRAF-6 nell'incremento
dell'osteoclastogenesi in pazienti HIV+ in cART**

Tesi di Dottorato di Ricerca

Federico Angelo Cazzaniga

Matricola N. R11153

Tutor: Prof.ssa Giulia Carla Marchetti

Coordinatore del Dottorato: Prof.ssa Antonella d'Arminio Monforte

Anno Accademico 2016-2017

<i>Legenda:</i>	4
1. INTRODUZIONE	6
INFEZIONE DA HIV E PATOLOGIE DELL'INVECCHIAMENTO.....	6
2. TURNOVER OSSEO FIOLOGICO	7
2.1. <i>Struttura e rimodellamento osseo</i>	7
2.1.1. Fase di attivazione	8
2.1.2. Fase di inversione	8
2.1.3. Fase di terminazione	9
2.2. <i>Osteoclasti</i>	9
2.2.1. Precursori circolanti degli osteoclasti.....	12
2.3. <i>Sistema OPG/RANKL/RANK</i>	14
2.4. <i>Ruolo di IFN-γ sull'osteoclastogenesi</i>	16
3. PATOGENESI DELLE ALTERAZIONI DEL METABOLISMO OSSEO IN CORSO DI INFEZIONE DA HIV	17
3.1. <i>Ruolo di HIV</i>	18
3.2. <i>Ruolo della terapia cART nel rimodellamento osseo</i>	19
3.3. <i>Ruolo del sistema immunitario</i>	22
4. SOCS-1	24
4.1. <i>Ruolo di SOCS-1 nell'osteoclastogenesi</i>	24
4.2. <i>SOCS-1 in HIV</i>	26
2. SCOPO DELLO STUDIO	27
3. MATERIALI E METODI	29
3.1. RECLUTAMENTO PAZIENTI	29
3.2. STUDIO DEI PRECURSORI OSTEOCLASTI	30
3.2.1. Isolamento delle cellule mononucleate da sangue periferico	30
3.2.2. Citofluorimetria	30
3.3. DIFFERENZIAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI OSTEOCLASTI MATURI	30

3.3.1. Separazione immunomagnetica	30
3.3.2. Differenziamento di CD14+ ex vivo in osteoclasti	31
3.3.3. TRAP staining	31
3.3.4. Saggio di riassorbimento	32
3.3.5. TRAP colorimetrico	32
3.4. REALTIME PCR	32
3.5. WESTERN BLOT	34
3.5.1. Estrazione Proteica	34
3.5.2. Dosaggio Proteico	34
3.5.3. Elettroforesi SDS-Page	35
3.5.4. Blocco ed incubazione con anticorpo primario e secondario	35
3.5.5. Sviluppo	36
3.6. ANALISI STATISTICA	36
4. RISULTATI	37
4.1. <i>Caratteristiche dei pazienti in studio</i>	37
4.2. <i>I soggetti HIV+ mostrano una frequenza maggiore di precursori osteoclastici circolanti rispetto ai soggetti HIV-</i>	39
4.3. <i>I pazienti HIV+ rBMD mostrano una maggiore potenza differenziativa ex-vivo in osteoclasti derivanti da monociti</i>	42
4.4. <i>I monociti dei soggetti HIV+ e HIV- non mostrano differenze significative nell'espressione del recettore RANK</i>	45
4.5. <i>OC dei pazienti HIV + mostrano una espressione aumentata di SOCS-1 , TRAF-6 e Catepsina K ..</i>	46
4.6. <i>Disregolazione del pathway SOCS-1/TRAF6 in OC di pazienti HIV+ con ridotta BMD</i>	48
4.7. <i>Lo stimolo esogeno con IFN-γ modula il pathway SOCS-1/TRAF-6 in OC differenziati ex-vivo di pazienti HIV+ rBMD</i>	51
4.8. <i>interazione tra infezione da HIV, ridotta BMD e disregolazione genica</i>	54
5. DISCUSSIONE	58
BIBLIOGRAFIA	63

Legenda:

BMD	<i>Bone mineral density</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
cART	<i>Combination Antiretroviral Therapy</i>
c-Fms	<i>Macrophage colony-stimulating factor receptor</i>
CPT	<i>Calcitonin</i>
CTSK	<i>Cathepsin K</i>
DXA	<i>Dual-energy X-ray absorptiometry</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
GFR	<i>Glomerular filtration rate</i>
HBV	<i>Hepatitis B virus</i>
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen- antigen d related</i>
IFN-γ	<i>Interferon gamma</i>
INI	<i>Integrase inhibitor</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
KO	<i>Knockout</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
nBMD	<i>Normal Bone mineral density</i>
NFATc1	<i>Nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NNRTI	<i>Non nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>
OC	<i>Osteoclast</i>
OCP	<i>Osteoclast Precursor</i>
OPG	<i>Osteoprotegerin</i>
P1NP	<i>Serum type 1 protocollagen</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PI	<i>Protease inhibitor</i>

PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PTH	<i>Paratormon</i>
qRT-PCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
RANK	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor κ B</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
rBMD	<i>Reduce Bone mineral density</i>
RUNX-2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
SOST	<i>Sclerostin</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor superfamily</i>
TRAF-6	<i>TNF receptor associated factors 6</i>
TRAP	<i>Tartrate resistant acid phosphatase</i>
αvβ3	<i>Vitronectin</i>

1. Introduzione

Infezione da HIV e patologie dell'invecchiamento

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) appartiene alla famiglia dei retrovirus, in particolare al genere lentivirus, virus a RNA in grado, grazie all'enzima virale trascrittasi inversa, di trascrivere l'RNA virale in DNA e integrarsi nel genoma dell'ospite. HIV infetta le cellule del sistema immunitario. In particolare, l'HIV attacca e distrugge i linfociti T helper, o CD4, che sono di cruciale importanza per il sistema immunitario e la relativa risposta immunitaria, portando ad una grave linfopenia.

L'introduzione della terapia antiretrovirale combinata (cART) ha profondamente modificato il decorso dell'infezione da HIV, riducendo la morbilità e mortalità AIDS correlata, e trasformando l'infezione da HIV in una patologia cronica [1, 2].

La soppressione della replicazione dell'HIV mediante la cART porta ad un miglioramento dell'attivazione immunitaria, una ripresa del numero dei CD4 e una ricostituzione delle funzioni immunitarie, quali le risposte proliferative ai patogeni opportunisti [3].

Tuttavia, numerosi studi hanno evidenziato che la popolazione HIV positiva mantiene livelli di infiammazione sistemica più elevati rispetto alla popolazione HIV negativa. La persistenza di immunoattivazione rallenta la formazione di CD4 naive in favore di cellule T-senescenti, portando ad una "senescenza immunitaria" [4, 5].

In questi processi di immunosenescenza si riscontrano patologie legate all'invecchiamento. Fra questi, problemi cardiovascolari, renali ed epatici, lipodistrofia e alterazioni del metabolismo osseo con un aumentato rischio di fratture [6, 7].

Diversi sono i fattori che possono influenzare l'insorgenza di queste condizioni cliniche come: l'infiammazione, la disregolazione immunitaria, le tossicità dei farmaci nel lungo periodo e coinfezioni quali l'epatite B e C (HBV e HCV) [8, 9].

Oggi, la gestione clinica dell'infezione da HIV prevede lo studio delle principali comorbidità HIV-correlate, al fine di poter definire il profilo metabolico di ogni paziente, ed utilizzarlo come guida nella gestione delle patologie stesse e nella scelta della cART più adeguata al paziente.

2. Turnover osseo fisiologico

2.1. Struttura e rimodellamento osseo

Il tessuto osseo fa parte dei tessuti connettivi specializzati per la funzione di protezione e sostegno. Esso è costituito da cellule, fibre e matrice complessa, in cui si distinguono una parte organica e una inorganica. La componente inorganica (69%) è costituita principalmente da un complesso cristallino di calcio e fosfato $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (idrossiapatite), mentre la parte organica comprende collagene (tipo I) e proteine strutturali non collagene come proteoglicani e glicoproteine [10, 11].

Il tessuto osseo non è statico, ma è soggetto a rinnovamento per l'intera durata della vita. L'insieme dei processi di rimozione e formazione di nuovo tessuto è denominato rimodellamento osseo. Ciò si verifica grazie ad una stretta correlazione funzionale tra le cellule ossee e i numerosi fattori che ne coordinano l'attività, la regolazione e il mantenimento. Le principali cellule coinvolte nel rimodellamento sono:

- gli osteoblasti che derivano da cellule mesenchimali e sono responsabili della formazione, dell'organizzazione strutturale e della mineralizzazione della matrice ossea extracellulare;
- gli osteoclasti che derivano dalla fusione di precursori della linea monocita/macrofago e hanno la funzione di riassorbire la matrice ossea;
- gli osteociti cellule mature dell'osso, che secernono la matrice extracellulare e rimangono intrappolati nelle lacune, diventando cellule quiescenti.

Ogni ciclo di rimodellamento si compone di tre passaggi sequenziali obbligati: la fase di attivazione, la fase di inversione e la fase di terminazione [12].

2.1.1. Fase di attivazione

Il ciclo di rimodellamento inizia con il reclutamento dei pre-osteoclasti, la loro differenziazione in osteoclasti maturi e l'avvio del riassorbimento osseo. I monociti vengono richiamati nel sito di riassorbimento tramite fattori chemiotattici come MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) [13]. MCP-1 viene prodotta da osteoblasti e osteociti che, producendo RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), stimolano l'espressione dei recettori per la MCP-1 sugli osteoclasti [14]. Molteplici fattori possono regolare indirettamente il processo di osteoclastogenesi, agendo come fattori solubili sugli osteoblasti, quali il paratormone (PTH), l'interleuchina-1 (IL-1), il TNF- α (tumour necrosis factor alpha), e la vitamina D3. La formazione degli osteoclasti maturi è dettata dall'interazione tra precursori ematopoietici e cellule della linea osteoblastica esprimenti sulla loro superficie il ligando osteoclastogenico RANKL [15]. Durante il processo di riassorbimento gli osteoclasti, tramite transitosi, rilasciano a livello extracellulare prodotti della matrice ossea degradata, come TGF (transforming growth factor), BMPs (bone morphogenetic protein), IGF-II (insulin-like growth factor II) e calcio. Il riassorbimento osseo ha una durata di circa 2-4 settimane durante ogni ciclo di rimodellamento.

2.1.2. Fase di inversione

In questa fase si assiste a livello cellulare al passaggio dal riassorbimento alla formazione ossea. I fattori TGF, BMPs e IGF-II secreti dagli osteoclasti reclutano i pre-osteoblasti nelle lacune di riassorbimento promuovendo il differenziamento in senso osteogenico e regolando l'espressione di fattori trascrizionali importanti come RUNX-2 (Runt-related transcription factor 2), Osx (Osterix), Dlx5 (distal-less homeobox 5 gene) [16]. Le macromolecole rilasciate dalla matrice non sono sufficienti per determinare l'attivazione degli osteoblasti a discapito degli osteoclasti. Infatti, un ruolo importante è svolto dalle efrine, che favoriscono l'interazione tra le due linee cellulari e sono in grado di trasdurre il segnale in maniera bidirezionale.

Questa regolazione è mediata attraverso il legame trans-membrana, Efrina-2, sugli osteoclasti e la tirosina chinasi recettoriale, Efrina-B4 (Ephrin type-B receptor 4), sugli osteoblasti e sugli

osteociti. Gli osteoblasti possono inibire la formazione di osteoclasti tramite Efrina-4 e gli osteoclasti stimolare la differenziazione degli osteoblasti attraverso Efrina-2 [17]. La differenziazione osteoblastica è indotta dalla segnalazione di Efrina-2 verso Efrina-B4 con conseguente inibizione della GTPasi RhoA (Ras homolog gene family, member A) e formazione di tessuto osseo.

Questa fase procede molto lentamente e dura molto più a lungo rispetto il processo di riassorbimento [15].

2.1.3. Fase di terminazione

Una volta che l'osso si è formato, gli osteociti producono sclerostina (SOST) che inibisce la neodeposizione degli osteoblasti e favorisce la costituzione di cellule di rivestimento [18].

Il mancato equilibrio tra riassorbimento e neo formazione durante il processo di rimodellamento può generare importanti conseguenze a carico della massa ossea. Si possono distinguere patologie caratterizzate dall'aumento della massa come l'osteopetrosi, o patologie caratterizzate dalla diminuzione della densità minerale ossea (BMD) come l'osteoporosi.

2.2. Osteoclasti

Le prime cellule multinucleate e voluminose presenti in prossimità delle trabecole ossee vennero descritte da *Robin CH.* nel 1849 con il nome di mieloplassi [19]. Successivamente nel 1872 *Kölliker A.*, coniando il termine Ostoklast, ipotizzò che queste cellule potessero formarsi dal midollo osseo e avessero come ruolo fisiologico il riassorbimento del tessuto osseo [20].

Diversi studi *in vitro* e *in vivo* tra il 1950 e il 1970 dimostrarono il ruolo principale degli osteoclasti come uniche cellule in grado di modificare e distruggere il tessuto osseo [21].

Ad oggi, gli osteoclasti sono descritti come cellule giganti, multinucleate e in grado di riassorbire la matrice ossea. Essi derivano dalla fusione dei loro precursori, rivelati per la prima volta da *Young RW.* nella linea cellulare monociti/macrofagi nel sangue periferico [22]. Rispetto ai suoi precursori

gli osteoclasti mantengono l'espressione superficiale del recettore c-Fms (macrophage colony-stimulating factor receptor), guadagnando l'espressione dell'integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, nota anche come vitronectina, e il recettore della calcitonina (CPT), ma perdendo l'espressione di CD11b [23, 24].

M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) e RANKL sono le due citochine essenziali per la differenziazione e l'attività degli osteoclasti [25]. M-CSF ha un ruolo fondamentale per la differenziazione osteoclastica, poiché dati di letteratura dimostrano che in topi $\text{Csf1}^{\text{op}}/\text{Csf1}^{\text{op}}$ la mutazione o delezione del gene *Csf1* (colony stimulating factor 1), codificante per M-CSF, sviluppa un grave fenotipo osteopetrotico senza nessuna evidenza di attività osteoclastica [26-28]. M-CSF si lega al suo recettore c-Fms, espresso sui precursori osteoclasti [29]. L'interazione di M-CSF con c-Fms fornisce segnali di sopravvivenza e proliferazione ai precursori osteoclasti. La fosforilazione del c-Fms comporta l'inizio di una cascata di segnale intracellulare che coinvolge le vie ERK (extracellular signal-regulated kinases) e PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase), bloccando i processi di morte cellulare programmata.

La seconda citochina fondamentale per il differenziamento degli osteoclasti è RANKL, membro della superfamiglia dei TNF. Viene prodotta prevalentemente da osteociti [30], da cellule stromali e cellule T attivate e si riscontra sia legata alla membrana che in forma solubile [31]. RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B) è il suo recettore, è una proteina trimerica che appartiene anch'esso alla superfamiglia dei TNF, che dopo il legame di RANKL, induce il differenziamento di monociti o macrofagi in osteoclasti e attiva il riassorbimento osseo in osteoclasti maturi [32]. Il ruolo fondamentale delle interazioni RANKL/RANK per la formazione/attività degli osteoclasti è dimostrato in topi RANKL^{-/-} e RANK^{-/-}, dove si osserva una diminuzione nella formazione di OC che genera un grave fenotipo osteopetrotico [33].

Gli osteoclasti si legano all'osso, polarizzano, formano una zona di tenuta al bordo increspato, riassorbono e alla fine subiscono l'apoptosi.

L'aderenza osteoclastica alla superficie ossea è regolata dalle integrine, il più prevalente dei quali è l'integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, chiamata anche recettore della vitronectina [34]. Il ruolo delle integrine è quello di mediare l'adesione degli osteoclasti alla superficie ossea [35]. Di tutte le integrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ è in

grado riconoscere la sequenza aminoacidica Arginina-Glicina-Acido aspartico (RGD) [36], espressa da vitronectina, fibronectina, trombospondina [37] e osteopontina [38]. Il legame di $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ al motivo RGD consente l'adesione osteoclastica e il movimento attraverso la superficie ossea durante il processo di riassorbimento [34].

La polarizzazione della membrana è un segno distintivo di osteoclasti maturi/riassorbenti e ha lo scopo di organizzare la cellula al fine di degradare il tessuto. Questo processo non può essere compiuto tramite fagocitosi, essendo l'osso troppo ampio per essere degradato a livello intracellulare, ma avviene extra-cellula. La fusione di precursori mononucleari per formare osteoclasti maturi multinucleati aumenta notevolmente la dimensione cellulare, ma questo non è sufficiente a garantire il degrado intracellulare. Pertanto, si attiva un meccanismo extracellulare che consente il rilascio di tutti i componenti necessari per il riassorbimento in un compartimento intracellulare isolato, chiamato "lacuna di Howship" [39].

Gli osteoclasti polarizzano i filamenti di actina in una struttura denominata anello di F-actina, segno distintivo di queste cellule. Integrine e anelli di F-actina sono contenute in strutture chiamate podosomi che creano un microambiente isolato, denominato zona di tenuta [40].

L'ambiente all'interno della zona di sigillatura viene acidificato dal rilascio di protoni da una V-ATPasi e di Cl^- da un canale di cloruro, arrivando ad un pH compreso tra 3 e 4 [41] (Figura 1). Il riassorbimento dell'osso è mediato da un ampio pannello di idrolasi acide, tra i quali la cisteina proteasi catepsina K (CTSK) e la fosfatasi acido tartrato resistente (TRAP), le più note a livello delle lacune di Howship. La cathepsina K è coinvolta nel degrado del collagene di tipo I [42], mentre il ruolo di TRAP non è stato ancora completamente compreso. Il rilascio di vescicole contenenti CTSK avviene attraverso il confine increspato, un altro segno distintivo della struttura osteoclastica. Il bordo increspato consiste in estrusioni membranose che rilasciano, tramite esocitosi, le vescicole contenenti la CTSK nella zona di sigillatura [43].

Osteoclasti maturi esprimono anche considerevoli livelli di metalloproteinasi di matrici (MMP) [44]. MMP-9 sembra essere coinvolta nella migrazione degli osteoclasti [45] e topi MMP-9^{-/-} mostrano difetti nello sviluppo osseo, nell'angiogenesi intraossea e nella riparazione di fratture.

[46]. Questi fenotipi suggeriscono un forte coinvolgimento di MMP-9 nella scissione del collagene di tipo I e della lamina nella membrana basale [47]. MMP-2 ha un ruolo nello sviluppo degli osteoclasti, infatti, topi MMP-2^{-/-} mostrano il 50% in meno di osteoclasti *in vivo* e alterazioni della differenziazione *in vitro* [48]. Mentre, MMP-13 è espresso soprattutto dagli osteoblasti e sembrerebbe contribuire alla degradazione del collagene di tipo I insieme alla catepsina K e MMP-9 [49].

Alla fine del processo di riassorbimento gli osteoclasti vanno incontro ad apoptosi e vengono sostituiti dagli osteoblasti, che formeranno il nuovo tessuto nella fase di "formazione ossea".

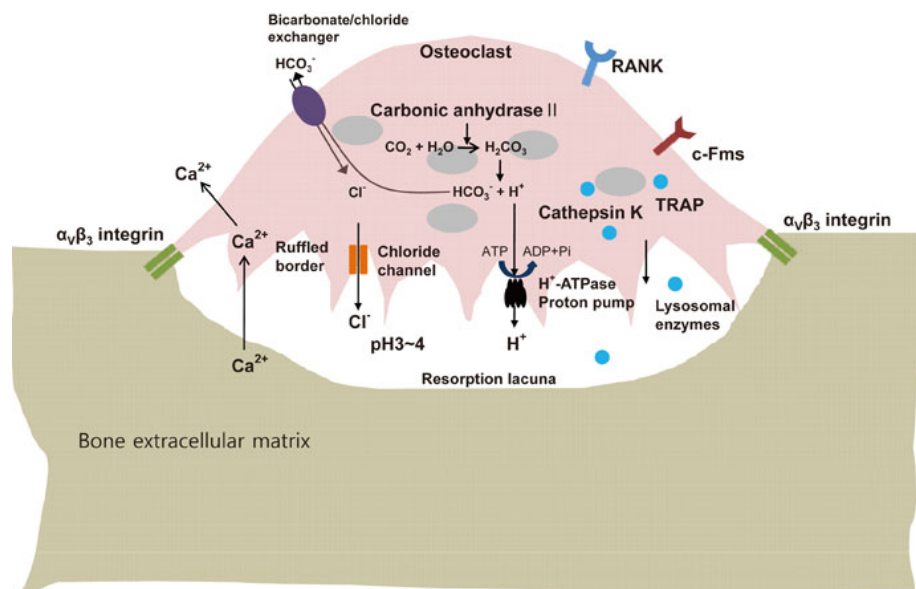


Figura 1. Riassorbimento osseo (Asagiri M, Takayanagi H, Bone, 2007)

2.2.1. Precursori circolanti degli osteoclasti

I precursori circolanti degli osteoclasti (OCP) sono stati inizialmente identificati come biomarcatori in pazienti con artrite psoriasica, e solo successivamente in artrite reumatoide, osteoporosi e gotta tofacea.

Diversi articoli sull'artrite psoriasica tra cui uno studio del gruppo di *Ritchlin CT* ha dimostrato che PBMC esprimenti marcatori CD11b, CD14, CD51 / CD61 e RANK possono essere considerati OCP mononucleari [50].

Successivamente, esperimenti in pazienti con patologie come l'artrite reumatoide, hanno evidenziato che oltre il marker monocitario CD14+, avesse importanza anche il marcatore CD16. Infatti, i monociti umani CD14+ possono essere divisi in due sottoinsiemi CD16- e CD16+ [51]. Le cellule esprimenti marcatori CD14+ CD16+ possono differenziarsi in OC e vengono classificate come OCP [52]. CD14 è il recettore per complessi di lipopolisaccaride (LPS) e proteina legante LPS. CD16 è il recettore a bassa affinità per la regione Fc di IgG (recettore Fc γ tipo III) e svolge un ruolo importante nella clearance dei complessi immunitari [53].

Rispetto ai monociti convenzionali CD14+/CD16-, i monociti CD16+ hanno dimostrato di possedere una maggiore espressione di antigeni del complesso di istocompatibilità di classe II (MHC), di diverse molecole di adesione e di una minore espressione dell'interleuchina-10 (IL-10) [54, 55]. Il ruolo fisiopatologico del sottogruppo dei monociti CD16+ è stato dimostrato dalla sua espansione in varie condizioni infiammatorie come sepsi, infezione da virus dell'immunodeficienza umana, tubercolosi, asma, emodialisi, e tumori solidi [56].

CD51/CD61 è un complesso di integrine noto come $\alpha V\beta 3$. Viene espresso ad alto livello sugli osteoclasti, le cellule endoteliali e a bassi livelli su piastrine e macrofagi. CD51/CD61 sono stati descritti anche come recettori della vitronectina, sono importanti per mediare l'adesione e l'interazione cellula-cellula attraverso l'interazione con il CD31 [52].

È stato dimostrato che circa il 2% dei PBMC possono essere stimolati per dare origine ad osteoclasti *in vitro*. Presumibilmente, gli eventi a livello del midollo osseo e durante la circolazione determinano il destino di un particolare monocita. Infatti, dopo l'esposizione a RANKL e M-CSF, una sottopopolazione di monociti rapidamente perde il marker CD14 e acquista un fenotipo osteoclastico, sottolineando l'importanza fondamentale del percorso di segnalazione RANK nell'osteoclastogenesi [57].

2.3. Sistema OPG/RANKL/RANK

Il recettore RANK insieme al ligando RANKL e il recettore solubile specifico per RANKL denominato osteoprotegerina (OPG), sono stati identificati come membri della super famiglia dei fattori di necrosi tumorale (TNF). Il sistema OPG/RANKL/RANK è stato riconosciuto come il principale regolatore dell'osteoclastogenesi [58].

L'OPG è stata scoperta e sintetizzata intorno al 1997 in modo indipendente da due gruppi di ricerca l'Amgen inc. e la Snow Brand Milk [59]. A differenza di altri membri della superfamiglia dei TNF, OPG non presenta domini trans-membrana e citoplasmatici e viene secreta come proteina solubile di 380 aminoacidi [60]. L'mRNA di OPG è risultato essere espresso in diversi tessuti, tra cui polmone, cuore, rene, fegato, ossa e midollo spinale. Tuttavia le principali azioni biologiche svolte da OPG sono focalizzate alla protezione del tessuto osseo inibendo l'osteoclastogenesi e la calcificazione vascolare. Studi con topi OPG^{-/-} hanno mostrato una grave osteopenia con un incremento nella formazione di osteoclasti [61].

Successivamente alla caratterizzazione di OPG entrambi i gruppi, menzionati precedentemente, identificarono RANKL. Essa è una proteina trans-membrana omotrimerica di tipo II, costituita da 316 aminoacidi, che si riscontra tipicamente sugli osteoblasti o come proteina solubile [62]. Essa viene espressa principalmente a livello del tessuto osseo, ma anche nel midollo osseo e in tessuti linfoidi. RANKL è necessaria e sufficiente per la formazione, l'attivazione e la sopravvivenza degli osteoclasti.

Il recettore per RANKL è stato denominato RANK. RANK è una proteina transmembrana di 616 aminoacidi con un dominio extracellulare N-terminale e un grande dominio citoplasmatico C-terminale. Essa è espressa principalmente su cellule della linea monocitica/ macrofagica, cellule T e B, cellule dendritiche e fibroblasti.

Il ruolo essenziale e quasi esclusivo dell'asse OPG/RANKL/RANK *in vivo* è la regolazione degli osteoclasti nel turnover osseo.

Un meccanismo con cui è regolata la differenziazione e l'attività dell'osteoclasto avviene tramite il rilascio di osteoprotegerina (OPG) da cellule stromali, osteoblasti, cellule B o cellule dendritiche. OPG è un recettore solubile per RANKL, che impedisce il legame di RANKL a RANK [59, 63] (Figura 2). La parte intracellulare di RANK è associata a diverse proteine della famiglia TNF, ma tra questi solo TRAF-6 è essenziale per la differenziazione osteoclastica [64, 65]. L'attivazione di TRAF-6 attiva due percorsi di segnalazione, la canonica I κ B chinasi e la non canonica IKK α chinasi, con conseguente attivazione a valle del fattore di trascrizione NF- κ B (nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells) [66]. NF- κ B attivato migra nel nucleo e stimola l'attivazione del fattore di trascrizione NFATc1 (Nuclear Factor of Activated T cells, cytoplasmic 1) e la successiva espressione di geni osteoclastogenici come l'acido fosfatasi tartrato resistente (TRAP), Catepsina K (CTSK) e il recettore di calcitonina [31, 67]. Un altro percorso che induce l'attivazione del fattore di trascrizione NFATc1 dopo il legame con RANKL è l'attivazione della proteina AP-1 (Activator Protein 1) mediata dalla MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) [68, 69]. Il ruolo della MAPK nell'attivazione dell'AP-1 è stato dimostrato *in vitro* anche se la specificità di questo percorso *in vivo* è ancora sconosciuta [70].

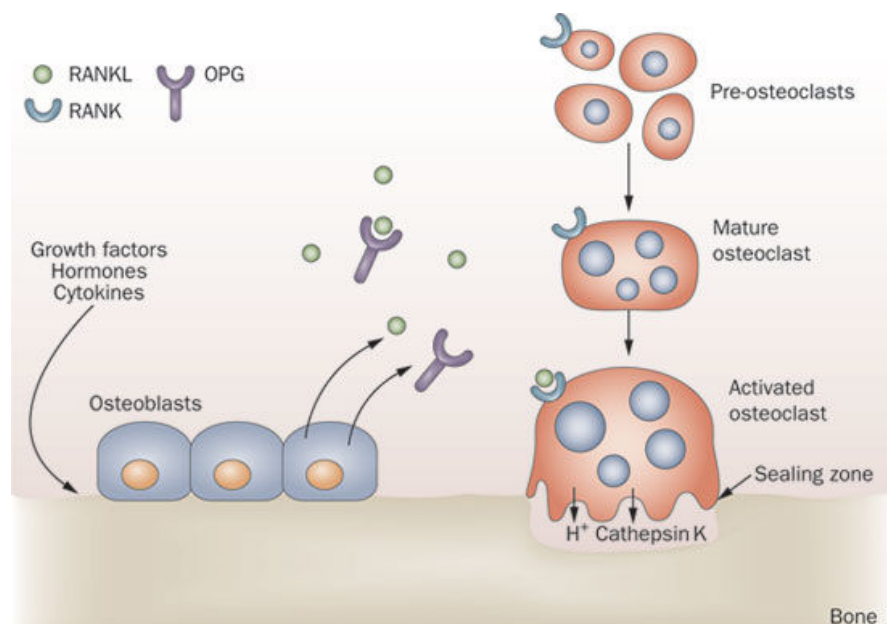


Figura 2. Ruolo del sistema OPG/RANKL/RANK nella maturazione e formazione di OC maturi (E. Michael Lewiecki, *Nature Reviews Rheumatology*, 2011)

2.4. Ruolo di IFN- γ sull'osteoclastogenesi

L'interferone- γ (IFN- γ) è prodotto principalmente da cellule T, NK, cellule B, macrofagi e cellule dendritiche. IFN- γ è un IFN di tipo II con un'ampia varietà di attività biologiche. *In vitro*, IFN- γ ha una azione inibitoria sul riassorbimento osseo mediante un'azione diretta sui progenitori degli osteoclasti. IFN- γ inibisce l'abilità della 1,25-diidrossivitamina D₃, del paratormone e dell'IL-1 di stimolare la formazione degli OC in colture di midollo osseo.

Uno dei meccanismi responsabili dell'inibizione dell'osteoclastogenesi da parte di IFN- γ è la degradazione di TRAF-6 mediante l'attivazione del sistema ubiquitina / proteasoma diminuendo così la segnalazione indotta da RANKL nei precursori degli osteoclasti [71]. Tuttavia, si è osservata anche l'abilità di IFN- γ di stimolare i linfociti T a produrre citochine pro-osteoclastogeniche come RANKL e TNF-alpha [72]. Gli effetti dell'IFN- γ sull'osso *in vivo* sono variabili perché sono stati riportati sia effetti inibitori che stimolanti.

Nei topi con artrite indotta da collagene, la perdita del recettore IFN- γ porta ad una maggiore degradazione del tessuto osseo [73]. Allo stesso modo, nei topi iniettati con endotossina batterica a livello cranico, la perdita del recettore IFN- γ ha determinato una maggiore capacità di riassorbimento osseo.

Al contrario, ratti sottoposti a iniezioni intraperitoneali di IFN- γ sviluppano osteopenia in otto giorni. Anche in pazienti con osteopetrosi la somministrazione di IFN- γ stimola il riassorbimento osseo invertendo parzialmente il decorso della malattia. Quest'ultimo effetto è probabilmente dovuto alla capacità di IFN- γ di stimolare la formazione di osteoclasti *in vivo*, o da una risposta immunitaria generalizzata.

Un'ultima ipotesi dell'inibizione nella formazione di osteoclasti è dettata da una diminuzione dei livelli di CTSK in topi trattati con IFN- γ [74]. In sintesi, l'IFN- γ può inibire la formazione di osteoclasti o aumentare l'osteoclastogenesi in base alle condizioni a cui sono esposti i precursori degli osteoclasti.

3. Patogenesi delle alterazioni del metabolismo osseo in corso di infezione da HIV

Un'elevata prevalenza di perdita di densità minerale ossea (BMD) è stata osservata in pazienti infettati da HIV [75]. La patogenesi dell'aumentata prevalenza di BMD ridotta è probabilmente multifattoriale ed è caratterizzata dal deterioramento della micro-architettura del tessuto osseo [76]. Dati in letteratura dimostrano che una ridotta BMD colpisce circa il 30% dei pazienti HIV positivi [77, 78]. Nel 2006 un'importante meta-analisi di *Brown TT* ha riportato un incremento dei livelli di osteoporosi e osteopenia nei soggetti HIV-positivi con un rischio aumentato di 3,7 per l'osteoporosi e 6,4 per BMD ridotta rispetto agli individui non infetti da HIV [79]. I meccanismi che conducono a queste complicazioni sono complessi e ancora non completamente chiariti [77]. Oltre alle principali cause della demineralizzazione ossea, che sembrano essere più frequenti in categorie di pazienti con bassa massa corporea, inadeguata attività fisica, fumo, uso di alcool, uso di oppiacei, esposizione agli steroidi, ipogonadismo; sono state associate anche l'attivazione persistente di citochine pro-infiammatorie e la compromissione della vitamina D [80, 81].

Inoltre, i regimi antiretrovirali svolgono un ruolo rilevante nella diminuzione della densità minerale ossea, ma data la complessità e la diversità dei regimi utilizzati nella pratica clinica, è molto difficile determinare l'esatto contributo di ciascun farmaco antiretrovirale. Nonostante queste difficoltà, sperimentazioni cliniche randomizzate hanno mostrato che dopo l'inizio del trattamento antiretrovirale, la perdita di BMD segue una diminuzione del 2-6% nelle prime 48 settimane di terapia, indipendentemente dal regime di trattamento [82].

In particolare, l'uso di tenofovir disoproxil fumarato (TDF) e, in misura minore, gli inibitori della proteasi (PI) sono associati ad un declino accelerato di BMD in soggetti naïve alla terapia antiretrovirale [83]. Sebbene il tasso di diminuzione del BMD osservato dopo l'avvio della cART generalmente si stabilizza con il tempo, ci sono indicazioni che l'uso prolungato di TDF possa essere associato a persistente aumento del tasso di declino della BMD.

Rimane ancora da chiarire se e come l'HIV possa essere associato in modo indipendente ad una ridotta BMD.

3.1. Ruolo di HIV

Diversi studi sperimentali suggeriscono che l'infezione di HIV associata ad un stato di iperattivazione immunologica possa portare ad una elevata perdita di densità minerale ossea. Studi *in vitro* hanno mostrato che proteine virali possano avere un effetto inibitorio sulla funzione degli osteoblasti e potrebbero colpire indirettamente l'osteoclastogenesi.

In particolare, la proteina virale gp120 incrementa il processo di apoptosi nella linea cellulare osteoblastica riducendo anche il deposito di calcio e la fosfatasi alcalina [84]. Infatti, la semplice esposizione di una coltura di osteoblasti alla gp120 è in grado di ridurre l'espressione del gene necessario al differenziamento osteoblastico, RUNX-2. Una disregolazione nel differenziamento delle cellule mesenchimali riguardanti la formazione degli osteoblasti contribuisce ulteriormente all'attività degli osteoblasti [85]. Inoltre, HIV gp120 è in grado di dare il via all'attivazione di PPAR- γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) determinando una svolta nel differenziamento delle cellule mesenchimali in adipociti a discapito della formazione degli osteoblasti [86, 87]. HIV gp120 sembra modulare anche la funzione e lo sviluppo degli osteoclasti. Infatti, questa proteina è conosciuta per attivare l'espressione di differenti molecole in PBMC come RANKL, il quale a sua volta gioca un ruolo essenziale nell'attivare e incrementare l'osteoclastogenesi [88] (Figura 3).

Inoltre, l'infezione di HIV in macrofagi stimola la produzione di M-CSF, seconda citochina essenziale per il differenziamento osteoclastogenico [89, 90].

Ci sono anche evidenze che l'infiammazione sistemica sia associata ad un cambiamento della massa ossea in pazienti HIV positivi. Infatti citochine diverse da RANKL e M-CSF come il TNF- α possono indurre un incremento del differenziamento e dell'attività degli osteoclasti [88], oppure portare all'apoptosi di osteoblasti con un meccanismo paracrino/autocrino [84]. Diversi studiosi hanno trovato una correlazione, in plasma, tra la carica virale di HIV e la concentrazione di TNF- α ,

ma in particolare un'associazione tra marcatori del riassorbimento osseo e l'attivazione di TNF- α [91].

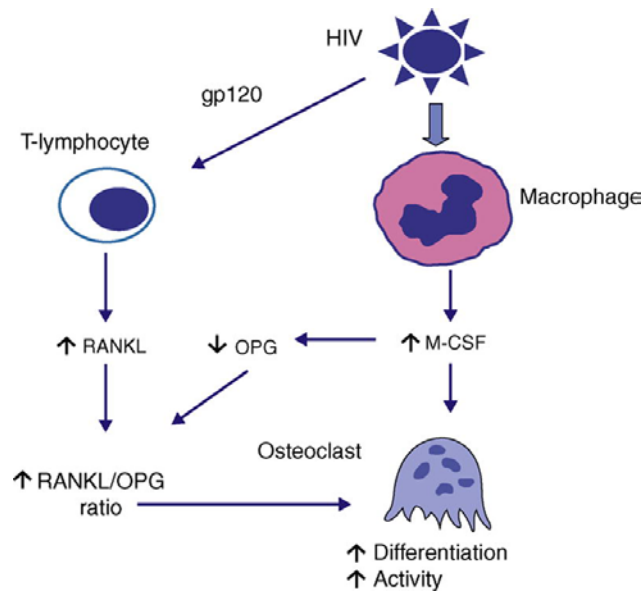


Figura 3. Descrizione dei principali meccanismi del virus HIV legati all'attivazione degli OC (Borderi M, et al., AIDS, 2009)

3.2. Ruolo della terapia cART nel rimodellamento osseo

I pazienti trattati con cART presentano, rispetto ai naïve, una maggiore prevalenza di osteopenia/osteoporosi. L'incremento dei livelli di marcatori specifici del turnover osseo, come osteocalcina e P1NP (serum type 1 procollagen), sono stati associati ad un aumento dei livelli di TNF- α e all'inizio della cART [92].

Un fattore importante legato alla perdita di massa ossea è sicuramente il numero di CD4+ prima dell'inizio della terapia. Infatti, uno studio longitudinale con una coorte di 796 pazienti, associa la bassa conta di CD4+ con lo sviluppo di patologie ossee dopo 96 settimane dall'inizio della cART. Questi dati suggeriscono che un inizio più tardivo della cART, sotto le 50 cellule/ μ l (CD4), porti ad

una perdita di tessuto osseo maggiore di circa 3% rispetto a pazienti che iniziano con 500 cellule/ μ l [93-95].

Il ruolo delle cellule T sulla regolazione della massa ossea è descritto approfonditamente in modelli murini KO per cellule T, in cui viene mimato l'effetto dell'inizio della cART con un trapianto di cellule T. La ricostituzione del sistema immunitario produce un incremento dei livelli di RANKL e TNF- α , con un cambiamento del rapporto RANKL:OPG, favorendo così il riassorbimento osseo [91, 96] (Figura 4).

La tossicità a livello osseo è variabile in base alla classe di farmaco utilizzato; all'interno di ogni classe gli effetti sull'osso sono differenti a seconda delle molecole utilizzate.

Uno dei costituenti fondamentali del *backbone* della terapia antiretrovirale è rappresentato dai farmaci nucleosidici inibitori della trascrittasi inversa virale (NRTI), che hanno un'azione inibitoria anche sulla DNA polimerasi γ , responsabile della replicazione del DNA mitocondriale (mtDNA). Questo causa una deplezione del mtDNA dando origine a tossicità mitocondriale, iperlattatemia e acidosi lattica, fenomeni che a loro volta interferiscono con il normale metabolismo dell'osso favorendo il processo di riassorbimento [97, 98].

Il tenofovir invece, pur facendo parte della stessa classe di farmaci antiretrovirali determina alterazione del metabolismo osseo in maniera indiretta, agendo a livello renale, andando a ridurre i livelli di GFR (glomerular filtration rate). Con la riduzione del GFR si riduce l'attività 1- α -idrossilasi renale, che si traduce in una ridotta produzione di 1,25(OH)₂-vitamina D, in una tossicità tubulare (ipofosfatemia e iperfosfaturia), e in una aumentata attività osteoclastica supportata dall'aumento dei marcatori del turnover osseo [99]. Tutte queste conseguenze sono in grado di indurre la deplezione dei fosfati, l'osteomalacia e la perdita di massa ossea [99, 100].

Un'altra classe di farmaci antiretrovirale è rappresentata dagli inibitori della proteasi (PI), farmaci che possono contribuire al danno osseo. Gli inibitori delle proteasi sono in grado di inibire gli enzimi appartenenti alla famiglia del citocromo P450, e studi *in vitro* hanno evidenziato la loro capacità di inibire l'1- α -idrossilasi renale con conseguente blocco del ciclo della vitamina D [101].

Infatti, studi epidemiologici come quelli sulla coorte ICONA evidenziano che il 54% delle persone con infezione da HIV presentano una carenza di vitamina D e addirittura, il 7% mostra un deficit assoluto della stessa [102-104].

Da questi dati si comprende che i meccanismi coinvolti nell'eziopatogenesi del danno a livello osseo in corso di cART sono molteplici e coinvolgono diverse classi farmacologiche. L'elevata prevalenza di pazienti con osteopenia/osteoporosi ed il progressivo invecchiamento della popolazione HIV positiva, hanno portato negli ultimi anni alla ricerca di un possibile regime di terapia antiretrovirale "bone sparing", introducendo anche nuove classi di farmaci come gli inibitori delle integrasi (INI).

Un studio longitudinale di *Brown et al.*, su 328 pazienti infettati da HIV, ha messo a confronto terapie composte da due NRTI più Atazanavir/r (PI) o Darunavir/r (PI) o Raltegravir (INI), andando a valutare il loro impatto sul metabolismo osseo. Pazienti che hanno seguito la terapia farmacologica con NRTIs + INI presentano una minore diminuzione della massa ossea a livello della colonna vertebrale e femorale, rispetto ai pazienti che hanno seguito un trattamento con NRTIs + PI [105]. Questi dati supportano la crescente evidenza che gli INI hanno un effetto minimo sull'osso dopo l'inizio della cART e completano i risultati dello studio SPIRAL, che ha mostrato un aumento della BMD totale nei partecipanti che sono passati da un PI a Raltegravir [106].

Altri INI sono stati identificati come ottimi farmaci adatti a pazienti con un elevato rischio di fratture, ad esempio Dolutegravir nella combinazione farmacologica dolutegravir + abacavir/lamivudine. Dopo 144 settimane, pazienti trattati con Triumeq presentano livelli di CTx (C-telopeptide), osteocalcina, fosfatasi alcalina (ALP) e P1NP minori rispetto al regime classico NRTIs + PI, suggerendo un minor impatto a livello osseo [107].

Negli ultimi anni con la commercializzazione di Genvoya (a base di Elvitegravir, Cobicistat, Emtricitabina, Tenofovir Alafenamide) sono stati raggiunti ottimi risultati riguardo la tossicità nel compartimento osseo. Infatti, nuovi trial confermano una diminuzione dei tipici marcatori ossei in

pazienti con il profarmaco Tenofovir Alafenamide rispetto a soggetti trattati con il precedente Tenofovir disoproxil fumarato [108, 109].

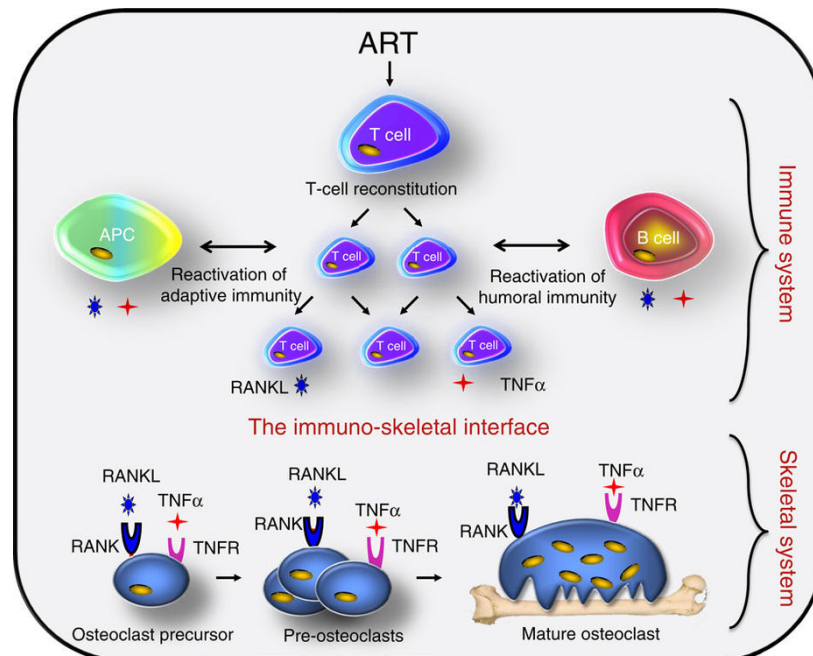


Figura 4. La ricostituzione del sistema immunitario (cellule T) con l'introduzione della cART, incrementa la produzione di citochine importanti per l'osteoclastogenesi (RANKL, TNF- α) in pazienti HIV+ (Ofotokun, I, et al., Nature communications, 2015)

3.3. Ruolo del sistema immunitario

L'iperattivazione immunitaria, unita alla conta della linfopenia e della carica virale rappresenta una delle tre caratteristiche peculiari e rilevanti che caratterizzano l'infezione da HIV. Un'importante causa di attivazione dell'immunità innata e adattativa è dovuta alla traslocazione microbica [110].

Un processo per il quale avviene il passaggio dal lume intestinale al torrente ematico di LPS o di batteri Gram negativi (G-) [110, 111]. LPS è stato descritto come prodotto microbico in grado di indurre il riassorbimento osseo *in vitro* e di stimolare la formazione di osteoclasti *in vivo* [112, 113]. Questo incremento nell'osteoclastogenesi è dovuto a un aumento di RANKL in circolo rilasciato da cellule osteoblastiche. Inoltre, alti livelli di LPS in circolo e marcatori di attivazione

monocitaria come sCD14 e sCD163 sono stati riscontrati in pazienti HIV positivi e sembrano essere associati alla perdita di BMD [114].

Questo stato di iperimmunoattivazione e infiammazione favorisce il rilascio di RANKL, mentre i livelli circolanti di OPG diminuiscono o rimangono invariati. Questo mancato equilibrio nella produzione delle due citochine comporta un cambiamento nel rapporto RANKL:OPG, favorendo l'attivazione del pathway osteoclastogenico.

L'infezione da HIV è associata inoltre ad una diminuzione del numero di cellule B e un incremento di cellule CD4/CD8 attivate ed esaurite. Nel 1998 *Yun T.* et al. hanno dimostrato come la citochina OPG potesse essere prodotta da cellule B. In particolare studi a livello del midollo osseo hanno evidenziato come circa il 60% della proteina OPG venisse secreta da subset e cellule B mature [115]. Alla luce di questi esperimenti, si osservò che cellule T attivate che esprimevano il ligando CD40 potessero interagire con il recettore CD40 espresso da cellule B andando a regolare l'espressione della proteina OPG e preservando l'omeostasi ossea [116]. Infatti, topi con cellule T non esprimenti CD40L presentano alterazioni della massa ossea con condizioni cliniche come osteopenia e osteoporosi [117].

Esperimenti su ratti HIV transgenici riuscirono a dimostrare l'associazione diretta tra sistema immunitario e patologia ossea legata all'infezione da HIV, sottolineando una riduzione di OPG e un incremento di RANKL secreta da cellule B mature.

Successivi studi clinici misero in evidenza una correlazione positiva tra lo sbilanciamento del rapporto OPG:RANKL e un incremento di fratture e osteopenia in soggetti HIV positivi [118].

Oltre all'azione delle cellule B nel produrre OPG, un importante ruolo viene svolto dalle cellule T che attivate producono citochine pro-osteoclastogeniche come TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17 e RANKL. Per studiare la relazione tra attivazione delle cellule T e BMD, uno studio clinico condotto da *Gazzola et al.* ha valutato 78 pazienti con infezione da HIV e ha evidenziato che quelli con bassa BMD hanno più alti livelli di attivazione delle cellule T (CD4, HLA-DR) e cellule T (CD8, HLA-DR). Questo fenotipo di cellule T attivate sembra essere un possibile predittore indipendente della bassa BMD [119].

Anche se la perdita di massa ossea in corso di infezione da HIV è multifattoriale, i dati riportati precedentemente dimostrano un forte sostegno immunologico nel contribuire alla diminuzione della BMD e alle elevate fratture presenti in pazienti HIV positivi.

4. SOCS-1

4.1. Ruolo di SOCS-1 nell'osteoclastogenesi

Il metabolismo osseo e il sistema immunitario sono fortemente correlati e entrambi sono regolati da diverse citochine comuni, come interferoni e interleuchine, prodotte nei microambienti ossei. Il soppressore della segnalazione citochina-1 (SOCS-1) è un importante regolatore negativo di tali citochine.

La famiglia SOCS è rappresentata da otto membri diversi: CIS (Cytokine-inducible SH2-containing protein) e da SOCS-1 a SOCS-7. In particolare CIS, SOCS-1, SOCS-2 e SOCS-3 sono indotte dalla stimolazione di citochine e inibiscono la stessa cascata che inizia la loro produzione, cioè un meccanismo di feedback negativo classico [120]. Numerosi studi hanno individuato che le proteine SOCS sono implicate nella regolazione di oltre 30 citochine, tra cui IL-6, LIF (leukemia inhibitory factor), leptina, G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor), IL-10, IFN- β e IFN- γ [121].

Alcune di queste citochine attivano la via di segnalazione intracellulare JAK/STAT. In questo percorso il legame del ligando porta all'oligomerizzazione del recettore attivando le Janus chinasi (JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk2).

Le proteine JAK agiscono come tirosin chinasi andando a fosforilare alcuni residui di tirosina e creando siti di ancoraggio per proteine di segnalazione contenenti SH2 (Src Homology 2) come la famiglia di proteine STAT (signal transducer and activator of transcription). Molteplici studi hanno evidenziato come diverse citochine e fattori di crescita attivino il complesso JAK/STAT, ad esempio, IFN- γ utilizza principalmente JAK1 che attivando STAT1 dà inizio alla cascata del segnale [122]. Partendo da questi meccanismi di attivazione nucleare, SOCS-1 è in grado di inibire

l'attività tirosin chinasi legandosi al loop delle JAK attraverso il dominio SH2, più precisamente in una regione composta da 12 aminoacidi denominata KIR (kinase-inhibitory region) [123, 124].

La disregolazione e il ruolo fisiologico di SOCS-1 sono stati descritti ampiamente in diverse patologie legate all'immunità. Topi KO per SOCS-1 sviluppano malattie neonatali fatali che portano alla morte dell'animale in circa tre settimane. In questi animali si sviluppa un'importante linfopenia e una patologia infiammatoria autoimmune mediata da cellule T. Questa patologia è caratterizzata da un'infiltrazione dei monociti nei principali organi portando principalmente alla necrosi del fegato. Questo fenotipo è fortemente ridotto in topi SOCS-1 KO trattati con anticorpi anti-IFN- γ , suggerendo il potente ruolo di SOCS-1 nel regolare IFN- γ *in vivo* [125-127]. Inoltre, sono state descritte altre patologie legate ad una ipermetilazione del gene SOCS-1 come: carcinoma epatocellulare, glioblastoma multiforme, leucemia mieloide acuta e leucemia mieloide cronica [128-130].

Nonostante l'ampia letteratura sul gene SOCS-1 ancora poco si conosce sul suo ruolo nell'osteoclastogenesi.

Il gruppo di *Ohishi M.* nel 2005 descrisse *ex vivo* e *in vivo* il ruolo di SOCS-1 nell'osteoclastogenesi. Gli esperimenti sono stati condotti con un modello murino eterozigote per SOCS1 in cui veniva indotto il riassorbimento osseo tramite somministrazione di LPS per 8 settimane. Cinque giorni dopo l'iniezione di LPS a livello cranico, hanno misurato la percentuale di superficie ossea ricoperta da osteoclasti e il numero di osteoclasti per millimetro di superficie ossea trabecolare. Le analisi quantitative valutate dalla superficie erosa e dal numero di OC hanno rivelato che lo sviluppo e l'attivazione degli OC indotti da LPS venivano soppressi in modo significativo nei topi SOCS-1 +/- . Questi risultati indicano che SOCS-1 è un importante regolatore del rimodellamento osseo nei siti infiammatori [131].

Anche se negli ultimi anni è stata investigata l'azione di SOCS-1 nell'osteoclastogenesi, il ruolo fisiologico nella differenziazione osteoclastica e nella funzione non è stato ancora del tutto chiarito.

4.2. SOCS-1 in HIV

Nonostante i diversi studi per comprendere l'azione di SOCS-1 sul rimodellamento osseo, ridotti esperimenti *in vitro* e *in vivo* sono stati effettuati per comprendere i meccanismi molecolari sull'osteoclastogenesi in pazienti HIV positivi.

Un'importante studio riguardo l'up-regolazione del gene SOCS-1 in corso di infezione da HIV viene descritto dal gruppo di Reid W. Gli esperimenti vengono condotti su ratti HIV transgenici dove viene descritta una correlazione tra danno osseo e disregolazione del pathway SOCS-1/TRAF6.

Questo studio dimostra che OCP di ratti HIV transgenici esprimono livelli elevati di SOCS-1 e TRAF6 che unito all'incremento di espressione di RANKL aumentano l'osteoclastogenesi e la resistenza alla soppressione della differenziazione osteoclastica mediata da IFN- γ (Figura 5). Il meccanismo molecolare di soppressione della segnalazione RANK da IFN- γ è stato chiarito, in cellule murine, da Takayanagi *et al.* dimostrando che l'IFN- γ induce il degrado di TRAF6 tramite un meccanismo dipendente da STAT-1 [71, 132].

Inoltre, anche in pazienti HIV positivi sono state osservate variazioni di citochine pro e anti-infiammatorie come IL-10, che sembrano incrementare i livelli di espressione di SOCS-1 determinando un'alterata produzione di IFN- γ da parte di cellule Th1 [133].

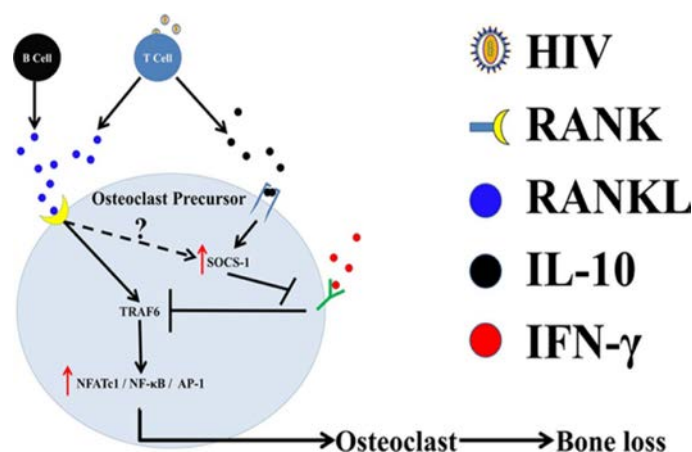


Figura 5. Ruolo di SOCS-1 nel promuovere l'osteoclastogenesi in OC di ratti HIV transgenici (Lafferty MK, *et al.*, Pathog Dis, 2014)

2. Scopo dello studio

Circa il 30% dei pazienti HIV positivi presenta una precoce riduzione della densità minerale ossea (BMD) che porta allo sviluppo di osteopenia e osteoporosi [77]. Sebbene le cause siano ancora da chiarire, diversi sono i fattori che contribuiscono alla perdita di equilibrio tra riassorbimento e neoformazione di matrice ossea. Si ricordano per esempio: la tossicità della terapia antiretrovirale combinata (cART), l'infezione da HIV e il progressivo invecchiamento dovuto ad un'iperattivazione T linfocitaria.

Sicuramente un ruolo chiave nella patogenesi della perdita di BMD in corso di infezione da HIV è svolta dalla cART. Studi clinici hanno permesso di individuare come diverse classi di farmaci, ad esempio gli inibitori delle proteasi, possano fortemente compromettere l'omeostasi ossea con un aumento del rischio di fratture.

Parallelamente all'azione tossica della cART, vi è anche un sostanziale contributo determinato dall'azione diretta di HIV sui principali componenti cellulari che caratterizzano il turnover osseo come gli osteoblasti e osteoclasti. Infine, un fattore in grado di influenzare il metabolismo osseo in corso di infezione da HIV è rappresentato dal sistema immunitario, tramite la produzione di citochine pro-infiammatorie e pro osteoclastogeniche.

Nonostante sia quindi evidente una relazione tra HIV, sistema immunitario e compartimento osseo, ancora molto poco si conosce sui meccanismi molecolari. Recentemente è stato riportato, in un modello di ratto HIV transgenico, il ruolo del gene SOCS-1 nel promuovere l'osteoclastogenesi in corso di infezione da HIV [132].

Sulla base di queste premesse, lo studio ha come scopo generale quello di comprendere i meccanismi molecolari che caratterizzano i pazienti HIV osteopenici/osteoporotici.

A tal scopo lo studio consta di tre obiettivi specifici:

1. Studio immunofenotipico.

Una percentuale significativa di pazienti HIV presenta un patologico turnover osseo, è stato quindi ipotizzato che tale condizione clinica possa essere determinata da una maggiore frequenza di precursori osteoclastici in circolo. Si sono pertanto valutati i livelli circolanti degli OCP in soggetti HIV positivi e HIV negativi con e senza osteopenia/osteoporosi.

2. Studio del potenziale osteoclastogenico *ex-vivo*.

Dati di lettura dimostrano un aumento dell'attività di riassorbimento a discapito della attività di neoformazione ossea. Obiettivo di questo studio è stato valutare il potenziale osteoclastogenico dei monociti di sangue periferico isolati da pazienti HIV positivi e soggetti sani.

3. Studio molecolare.

Studi recenti su OC di ratti HIV transgenici hanno evidenziato come livelli elevati del gene SOCS-1 possano indurre una disregolazione dell'osteoclastogenesi agendo anche sul ruolo inibitorio di IFN- γ . Obiettivo dello studio è stato valutare i livelli di espressione genica e proteica dei principali geni del pathway SOCS-1/TRAF6, prima e dopo trattamento con IFN- γ , su osteoclasti maturi differenziati *ex-vivo* da sangue periferico di soggetti HIV positivi.

3. Materiali e metodi

3.1. Reclutamento pazienti

40 pazienti HIV-positivi sono stati arruolati consecutivamente presso la Clinica di Malattie Infettive e Tropicali, Università di Milano, ASST Ospedale Santi Paolo e Carlo, Milano.

I pazienti sono stati classificati sulla base dell'analisi della densità minerale ossea mediante DXA, a livello della colonna lombare, del femore e total body:

- *Pazienti con normale densità minerale ossea (nBMD)*: valori di Z-score compresi fra +1 e -1 indicano una mineralizzazione ossea nella norma

- *Pazienti con ridotta densità minerale ossea (rBMD)*: valori di Z-score compresi tra -1 e -2.5 indicano osteopenia mentre valori < -2.5 indicano osteoporosi

Criteri di inclusione dallo studio:

- soggetti di sesso maschile
- non fumatori
- non dipendenti da alcool
- età compresa tra i 25 e 50 anni
- negativi per HCV/HBV

Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato, approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale.

Le diverse analisi di laboratorio, descritte nella tabella dei parametri viro-immunologici, sono state condotte al momento dell'inizio dello studio (Tabella 1).

Come gruppo di controllo sono, inoltre, stati arruolati 15 soggetti sani HIV-negativi, anch'essi suddivisi in due gruppi secondo i valori di DXA precedentemente specificati.

3.2. Studio dei Precursori Osteoclasti

3.2.1. Isolamento delle cellule mononucleate da sangue periferico

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state isolate da sangue intero mediante metodica Ficoll (Biocoll, BIOSPA, Milano, Italia), raccolti in 500ul di terreno R10 (composizione per 100ml di R10: 88 ml di RPMI, 10 ml di Siero Fetale Bovino (FBS), 1 ml [100 UI / mL] L-glutammina e 1 ml di penicillina/streptomicina da 20 [100 UI / mL] , Euroclone, Italia) con 500 uL di soluzione congelante (80% RPMI, Euroclone, Italia, , Saint Louis, Missouri, USA) e criopreservate in azoto liquido.

3.2.2. Citofluorimetria

Le PBMC criopreservate sono state scongelate in RPMI con 10% di FBS e successivamente marcate con i seguenti anticorpi fluorocromati: L/D BV520 per valutare la vitalità, CD14 PE-Vio770 (Miltenyi Biotec, Germania), CD16-PE-Cy5, CD11b-PE e CD51/61-FITC (BD Biosciences, San Jose, California, USA). In breve, 1×10^6 PBMC sono state marcate per 30 min al buio a 4°C, successivamente lavate con PBS, fissate con formaldeide 1%, misurate tramite citometro FACS VERSE (BD Biosciences, San Jose, California, USA) e analizzate con FlowJo V10 (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA).

3.3. Differenziazione e caratterizzazione di Osteoclasti maturi

3.3.1. Separazione immunomagnetica

Cellule CD14⁺ sono state isolate mediante selezione negativa, con biglie magnetiche, da PBMC (STEMCELL, EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit).

Al fine di effettuare una corretta separazione 50×10^6 PBMC sono state incubate con un cocktail di anticorpi (tutti tranne i CD14) per 10 minuti. Successivamente è stata aggiunta una sospensione di

nanoparticelle magnetiche e la provetta è stata incubata per 2 minuti in un magnete. Terminata la procedura è stata ottenuta una sospensione di monociti primari con una purezza del 97%. La purezza della separazione è stata valutata mediante citometria a flusso. Le cellule sono state incubate per 30 minuti al buio a 4°C con i seguenti anticorpi fluorocromati: L/D-BV520, CD14-PE-Vio770 (Miltenyi Biotec, Germania) e CD16-PE-Cy5 (BD Biosciences, San Jose, California, USA), misurate usando citometro FACS VERSE (BD Biosciences, San Jose, California, USA) e analizzate con FlowJo V10 (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA).

3.3.2. Differenziamento di CD14+ ex vivo in osteoclasti

Cellule CD14+ sono state piastrate in multiwell da 24 ad una densità di 5×10^5 in terreno α -medium supplementato con 100UI/mL L-glutamina, 100UI/mL penicillina/streptomicina e 10% FBS (Euroclone, Italia). Dopo l'adesione delle cellule alla piastra, per stimolare la formazione di osteoclasti, le CD14+ sono state stimulate con 20ng/ml M-CSF (Recombinant Human Macrophage Colony-Stimulating Factor) e 30ng/ml RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) (Sigma, St Louis, MO, USA) per 7/8 giorni. Tutte le colture sono state mantenute in incubatore a 37°C con il 5% di CO₂ e il terreno di coltura è stato sostituito ogni 2 giorni. Al termine del differenziamento le colture cellulari sono state trattate per 2h con 40 IU/ μ l di Rh- IFN- γ (R&D systems, Minnesota, Stati Uniti).

3.3.3. TRAP staining

La formazione di osteoclasti maturi è stata misurata quantificando le cellule positive per Fosfatasi acido tartrato resistente (TRAP). Le cellule sono state lavate con PBS e fissate in 3,7% di formaldeide per 10 minuti. Dopo il lavaggio con acqua deionizzata, le cellule sono state incubate a 37 ° C per 30 minuti all'oscurità in una miscela di soluzioni contenenti nitrite di sodio, Fast Garnet GBC, acido fosforico di naphthol AS-BI, acetato e tartrato dal kit Leucocyte Acid Phosphatase (Sigma, St Louis, MO, USA.). Infine, le cellule sono state colorate con ematossilina. Le cellule

multinucleate TRAP-positive con tre o più nuclei sono state classificate come osteoclasti. Immagini ottenute con microscopio ottico Micro vert (Zeiss).

3.3.4. Saggio di riassorbimento

Le cellule CD14+ sono state poste, ad una densità 5×10^5 , in piastre da 24 pozzetti contenenti una dentina ossea (Corning, Stati Uniti). Dopo l'adesione, le cellule sono state coltivate in terreno di coltura, come descritto in precedenza, e in presenza di 20ng/ml M-CSF e 30ng/ml RANKL (Sigma, St Louis, MO, USA). Il terreno di coltura e le citochine sono state sostituite ogni 2 giorni.

Dopo 7/8 giorni di coltura, le cellule sono state rimosse con 5% NaClO e l'area di riassorbimento è stata visualizzata tramite microscopio ottico Micro vert (Zeiss).

3.3.5. TRAP colorimetrico

Per quantificare l'acido fosfatasi tartrato resistente, su osteoclasti maturi in adesione, è stato usato il Kit Acid Phosphatase colorimetric assay (Cayman Chemical, Stati Uniti).

Il saggio sfrutta come substrato cromogenico per l'enzima il para-nitrofenil fosfato (pNPP). In una prima fase, TRAP defosforilizza pNPP e successivamente il gruppo fenolico OH viene deprotonato in condizioni alcaline, con conseguente formazione di p-nitrofenolato. Il p-nitrofenolato è caratterizzato da un intenso colore giallo che può essere misurato a 405-414 nm, calcolando indirettamente la produzione di TRAP.

3.4. RealTime PCR

L'RNA totale è stato estratto, tramite metodica Trizol (Sigma, St Louis, MO, USA), da cellule CD14+ subito dopo la separazione immunomagnetica e da OCs maturi alla fine del differenziamento.

Per l'analisi dell'espressione genica 1 µg di RNA totale è stato retroscritto con il sistema SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Thermo Fisher, Massachusetts, Stati Uniti) allo scopo di ottenere il cDNA corrispondente, utilizzando esameri come innesco.

Tutte le qRT-PCR sono state allestite con 25ng di cDNA e TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), no AmpErase® UNG (Thermo Fisher, Massachusetts, Stati Uniti) fino al raggiungimento di 20ul totali di soluzione. È stato impostato il seguente ciclo di amplificazione: denaturazione iniziale di 20 secondi a 95°C seguito da 40 cicli di amplificazione. Ciascun ciclo era costituito da uno step iniziale di denaturazione di 1 secondo a 95°C , uno step di annealing ed elongazione di 20 secondi a 60°C.

Nell'indagini Real Time PCR sono state utilizzate sonde TaqMan marcate alle estremità con molecole fluorescenti: il fluoroforo al 5' è il 6-carbossifluoresceina (FAM), mentre al 3' è la Tetrametilrodamin (TAMRA).

I primer scelti sono stati: TNFRSF11A (TNF receptor superfamily member 11a) , SOCS-1(suppressor of cytokine signaling 1), TRAF-6 (TNF receptor associated factor 6), MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) e CTSK (cathepsin K) (Thermo Fisher, Massachusetts, Stati Uniti). Come gene housekeeping è stato utilizzato GAPDH (Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi).

Per valutare l'eventuale contaminazione delle reazioni è stata utilizzata la mix per la PCR senza aggiungere il DNA stampo (controllo negativo). Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

I livelli di espressione dei geni sono stati calcolati mediante il metodo del $\Delta\Delta Ct$. I valori di Ct sono stati ottenuti mediante il software StepOne v 2.3 (Applied Biosystem), utilizzando il valore di threshold automaticamente calcolato.

3.5. Western Blot

3.5.1. Estrazione Proteica

Dopo 7/8 giorni di coltura cellulare, gli osteoclasti maturi sono stati distaccati dalla piastra e raccolti in eppendorf tramite Buffer di lisi composto da: 50mM Tris pH8, 1% NP-40 (Nonidet™ P 40 Substitute) (Sigma, Italia) e inibitori delle proteasi (Roche, Italia). Successivamente per evitare la proteolisi le cellule sono state mantenute in ghiaccio per 1 ora e centrifugate a 4°C per 15 minuti a 14000 rpm. Dal sovrantante così ottenuto sono stati prelevati 20ul per il dosaggio proteico, il resto è stato conservato a -80°C.

3.5.2. Dosaggio Proteico

Per misurare la concentrazione proteica è stato utilizzato il saggio BCA (Millipore, Stati Uniti), che sfrutta il metodo colorimetrico dell'Acido Bicinconinico. Il kit può essere usato per dosare proteine in un intervallo tra 20 e 2000 µg/ml. Le soluzioni A (Na₂CO₃, NaHCO₃, Tartrato di Sodio, Acido Bicinconinico in una soluzione 0,1M di NaOH) e B (soluzione al 4% di Cu₂SO₄) sono state miscelate in proporzione 50:1 rispettivamente per un volume finale di 1 ml.

Il dosaggio delle proteine è stato misurato allo spettrofotometro per risalire dal valore di assorbanza alla concentrazione. E' stato necessario allestire una retta di taratura, servendosi di diluizioni seriali di albumina sierica bovina (BSA) e considerando 8 punti da 0µg/ul a 2000 µg/ul. Standard e campioni sono stati aggiunti in volume di 50ul alla miscela di reattivi A+B e dopo agitazione per 30 secondi sono stati incubati per 30 minuti a 37°C. La quantificazione dei campioni è avvenuta leggendo l'assorbanza a $\lambda=562$ nm, tramite strumento EnSight Multimode Plate Reader (PerKin Elmer, Italia). Dopo essere risaliti alla concentrazione proteica è stato possibile preparare i campioni per effettuare la corsa elettroforetica.

3.5.3. Elettroforesi SDS-Page

Prima di caricare i campioni, ad una concentrazione finale di 20µg/ul, è stato aggiunto Laemmli Buffer 5X (2,3% SDS, 5% 2β mercaptoetanolo, 10% Glicerolo, 0.002% Blu di Bromofenolo e 0.0625% Tris HCl a pH 6.8). I campioni sono stati denaturati a 100°C per 5 minuti, quindi spinnati per pochi secondi e caricati nei pozzetti del gel. I campioni e il marker (Biorad, Italia) sono stati fatti correre in un gel per elettroforesi SDS-PAGE (10% acrilammide). La corsa è stata effettuata a un voltaggio di 80V per i primi 30 min e a 100V per 1 ora, il tutto in Buffer di corsa.

Al termine della corsa elettroforetica le proteine del Running Gel sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa per mezzo di un elettroblotter. Al termine del trasferimento, la membrana è stata colorata con Rosso Ponceau (Merck, Italia) per visionare il corretto trasferimento e poi decolorata con acqua distillata.

Buffer di corsa	Buffer di trasferimento
25 mM Tris	25 mM Tris
192 mM Glicina	192 mM Glicina
0.1% SDS	20% Metanolo
pH 8.3	pH 8.3

3.5.4. Blocco ed incubazione con anticorpo primario e secondario

La membrana è stata posizionata in una soluzione di bloccaggio costituita da PBS + 0,1% Tween (Sigma, Italia) (PBS-T) e 5% di polvere di latte, in agitazione per un'ora a temperatura ambiente. Successivamente la membrana è stata incubata, *overnight*, con l'anticorpo primario specifico diluito in PBS-T e polvere di latte 5%. Al termine la membrana è stata sottoposta a tre lavaggi da 10 minuti in PBS-T. In seguito è stata incubata per 1 ora con l'anticorpo secondario corrispondente coniugato a perossidasi di rafano (HRP), diluito 1:40000 in PBS-T addizionato con polvere di latte al 5%. La procedura è stata conclusa con tre lavaggi da 10 minuti PBS-T.

Proteina	Blocco	Ab Primario	Ab secondario
TRAF-6	1 h a temperatura ambiente in PBS-T + 5% latte	Anti-TRAF-6, in rabbit (Sigma)	Anti-Rabbit IgG in Goat

<i>SOCS-1</i>	1 h a temperatura ambiente in PBS-T + 5% latte	Anti-SOCS-1 (AB1) (Sigma)	Anti-Rabbit IgG in Goat
<i>β-actina</i>	1 h a temperatura ambiente in PBS-T + 5% latte	Rabbit monoclonal to Actin (HRP) (Abcam)	

3.5.5. Sviluppo

Il kit utilizzato per lo sviluppo in chemiluminescenza è Western ECL Blotting Substrates (Biorad, Italia). La membrana è stata posta, per 5 minuti, a contatto con una soluzione composta da ECL, un substrato della perossidasi che quando viene ossidato in presenza di H₂O₂ passa ad uno stato eccitato, emettendo luce. Infine, la membrana è stata letta tramite lo strumento UVITEC Cambridge (Alliance) e i risultati sono stati analizzati con il software UVITEC.

3.6. Analisi Statistica

Le variabili continue sono state presentate come mediane e range interquartile (IQR), mentre le variabili categoriche sono state rappresentate come numeri e percentuali. Il test Mann-Whitney è stato usato per il confronto tra due gruppi, mentre il Kruskal-Wallis è stato usato per il confronto tra tre o più gruppi. Le variabili categoriche sono state confrontate tramite test Chi-quadrato e test esatto di Fisher. L'ANCOVA è stata usata per analizzare i Fold change delle qRT-PCR dopo trattamento con IFN- γ . Un valore $p < 0.05$ è stato considerato significativo da un punto di vista statistico. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando GraphPad Prism (versione 7.0) tranne le analisi di COVARIANZA in cui è stato usato il software SAS.

4. Risultati

4.1. Caratteristiche dei pazienti in studio

Dei 40 pazienti HIV positivi in terapia cART arruolati, 16 sono risultati essere nBMD (z-score tra +1 e -1) e 24 rBMD (z-score tra -1 e -2.5).

Come da criteri di inclusione, la popolazione HIV+ arruolata era costituita da pazienti di sesso maschile (100%), non fumatori, con una età mediana minore di 50 anni e comparabile tra i due gruppi (nBMD 47 anni [45-48]; rBMD 43 anni [39-47] $p=.125$), in assenza di co-infezioni con entrambi i virus epatici e con una viremia soppressa inferiore alle 40cp/mL (Tabella 1).

Per quanto concerne i parametri HIV correlati, i soggetti arruolati presentavano un nadir mediano di linfociti T CD4+ di 214 cell/mmc (nBMD 205.5 cell/mmc [50-270]; rBMD 251.5 cell/mmc [67-335]; $p=.122$) e la durata dell'infezione di HIV era simile tra i due gruppi (Tabella 1). Tutti i pazienti avevano introdotto la terapia antiretrovirale da almeno 12 mesi, senza alcuna differenza nella durata della cART (nBMD 13.5 anni [6.5-15]; rBMD 9 anni [6-14]; $p=.312$; Tabella 1) e nel tipo di regime terapeutico (Tabella 1).

In particolare entrambi i gruppi seguivano un regime terapeutico contenente Tenofovir disoproxil fumarato e nessun paziente era in cura con bifosfonati (Tabella 1). Inoltre, i valori di vitamina D e l'uso di DIBASE erano equiparabili in entrambi i gruppi.

Se confrontati con gli HIV negativi di controllo (10 nBMD e 5 rBMD), i pazienti HIV infetti sono risultati con una maggior proporzione di uomini ($p=.0007$; Tabella 1) e con una età mediana comparabile ($p=.074$; Tabella 1).

Nessun'altra differenza nei parametri demografici, clinici e HIV correlati è stata riscontrata (Tabella 1).

Tabella 1. Parametri demografici e viro-immunologici.

	HIV+ nBMD (n=16)	HIV+ rBMD (n=24)	HIV- nBMD (n=10)	HIV- rBMD (n=5)	P
Sesso, maschi, (%)	16 (100)	24 (100)	10 (100)	0 (0)	.0007
Età, anni, (IQR)*	47 (45-48)	43 (39-47)	44 (30-56.75)	64 (53.50-70)	.074
Conta dei CD4 al tempo delle analisi, cell/mmc, (IQR)°	498 (432-679)	571 (411-643)	N/A	N/A	.803
CD4 nadir, cell/mmc, (IQR)°	205.5 (50-270)	251.5 (67-335)	N/A	N/A	.122
Ratio CD4/CD8, (IQR)°	0.65 (0.53-0.77)	0.80 (0.38-1)	N/A	N/A	.439
Diagnosi di AIDS, (si)°	2	1	N/A	N/A	.985
Durata della cART, anni, (IQR)°	13.5 (6.5-15)	9 (6-14)	N/A	N/A	.312
Tempo dal primo HIV Ab+ test, anni, (IQR)*	12.5 (6-16.50)	11.5 (6-24.25)	N/A	N/A	.890
HIV-RNA Log cp/mL, (IQR)*	<40	<40	N/A	N/A	1
Vitamina D, ng/ml, (IQR) *	23.24 (16.14-33.44)	19.17 (15.72-28.91)	N/A	N/A	.537
Aggiunta vitamina D (DIBASE 10.000 U.I/ml), si, (%)	100	100	N/A	N/A	1
Tipo di cART:					
PI (%)	7 (43.75)	10 (41.66)	N/A	N/A	.967
NNRTI(%)	8 (50)	12 (50)	N/A	N/A	
Altri(%)	1 (6.25)	2 (8.33)	N/A	N/A	
TDF (%)	96	98	N/A	N/A	.945

*NOTE: *I dati sono presentati come media (IQR) o °numeri assoluti (%). cART: terapia antiretrovirale combinata; PI, Inibitori delle proteasi; NNRTI, Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa; TDF, Tenofovir disoproxil fumarato; rBMD, ridotta densità minerale ossea; nBMD, normale densità minerale ossea; HIV, virus dell'immunodeficienza umana; AIDS, sindrome da immunodeficienza acquisita; N/A, non applicabile.*

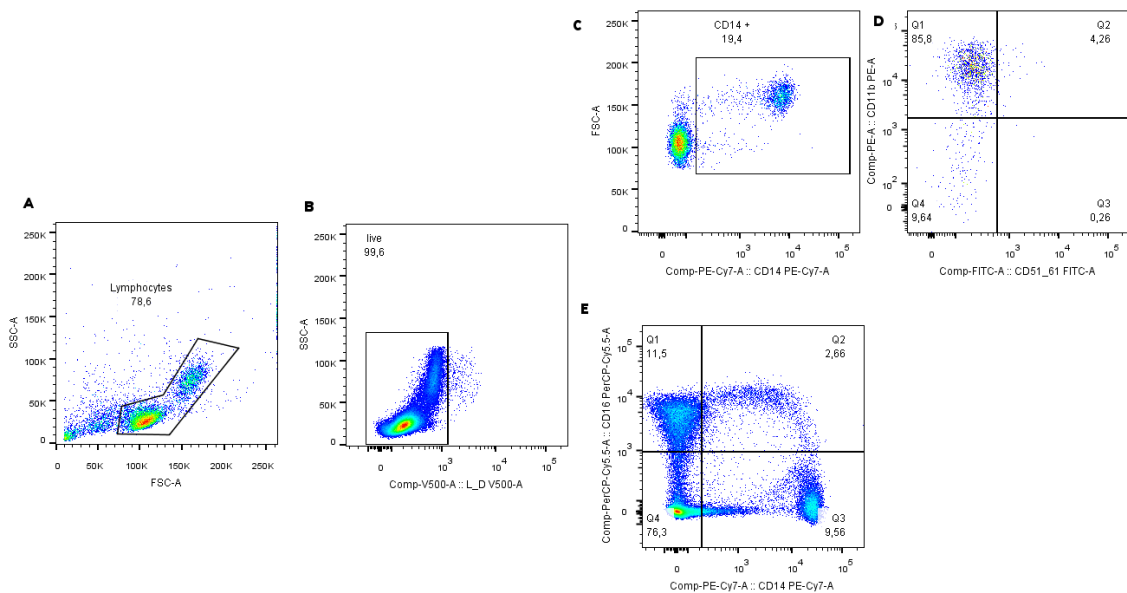
4.2. I soggetti HIV+ mostrano una frequenza maggiore di precursori osteoclastici circolanti rispetto ai soggetti HIV-

Poiché i pazienti HIV+ si caratterizzano per una alterata attività osteoclastogenica, abbiamo studiato nei due gruppi la frequenza dei precursori osteoclastici circolanti (OCP). Gli OCP sono stati valutati misurando le due diverse sottopopolazioni di monociti: CD14+/CD11b+/CD51/61+ e CD16++/CD14+ (Figura 6a). I soggetti HIV+ mostrano una maggiore frequenza di cellule CD14+/CD11b+/CD51/61+ circolanti rispetto agli HIV- (HIV+: 1.45 % [1.07-1.65] vs HIV-: 2.25 % [1.4-3.18] p=.047; Figura 6b).

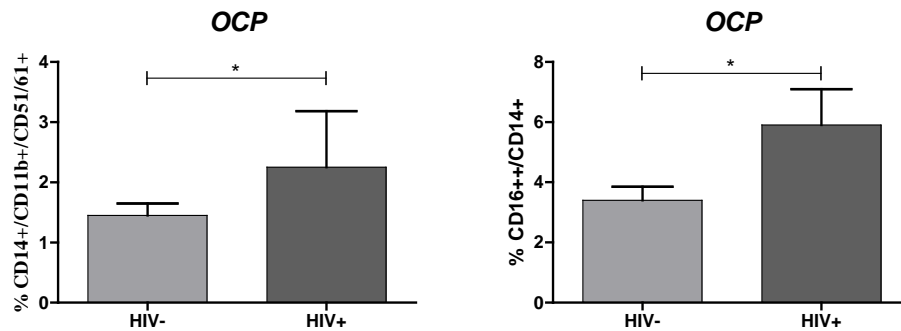
Analogamente, la frequenza della popolazione CD16++/CD14+ è risultata aumentata nei pazienti HIV+ rispetto agli HIV- (HIV+: 3.4 % [3.15-3.85] vs HIV-: 5.9 % [3.4-7.1] p=.037; Figura 6b).

Figura 6. Identificazione di OCP circolanti in corso di infezione da HIV

(a)



(b)



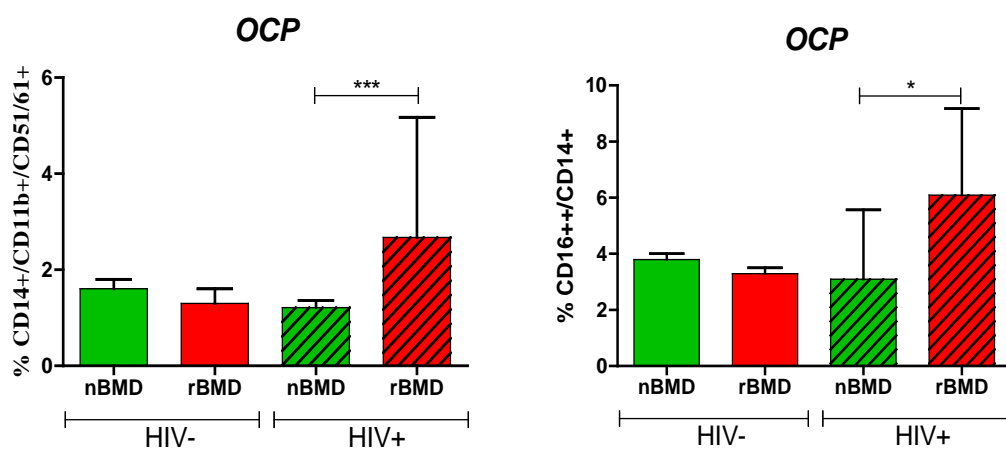
(a) Strategia di gating per l'identificazione di OCP derivanti dalle PBMC. A) Le cellule mononucleate sono state identificate sulla base dei parametri fisici (FSC, SSC) B) La vitalità dei PBMC è stata valutata tramite Live dead C) Le cellule vive sono state sottoposte ad un altro passaggio di gating determinando monociti CD14+ D) La valutazione degli OCP è stata valutata mediante la quantificazione percentuale degli eventi CD11b+ e CD51/61+ E) La valutazione degli OCP è stata inoltre valutata con i gating A e B e successivamente considerati gli eventi definiti CD16++/CD14+. (b) Valutazione della frequenza di cellule CD14+/ CD11b+/ CD51/61+ e CD16++/CD14+ in HIV- e HIV+. E' stata eseguita come analisi statistica un two-tailed t-test (Mann-Whitney): *=p<0.05.

Inoltre, confrontando i gruppi tra di loro sono emerse delle differenze interessanti. I soggetti HIV+ rBMD, infatti si caratterizzavano per una più alta frequenza sia in termini di CD14+/CD11b+/CD51/61 (HIV+ nBMD: 1.21 % [0.98-1.35] vs HIV+ rBMD: 2.67 % [1.62-5.17] p=.0002; Figura 7a) che di CD16++/CD14+ (HIV+ nBMD: 3.10 % [2.71-5.75] vs HIV+ rBMD: 6.1 % [3.50-9.17] p=.022; Figura 7a) (rispettivamente p=.0001, p=.0068) rispetto ai soggetti HIV+ nBMD. Al contrario, in modo molto interessante nessuna differenza è stata osservata nei pazienti HIV- sia in termini di frequenza della popolazione CD14+/CD11b+/CD51/61+ (HIV- nBMD: 1.6 % [0.98-1.80] vs HIV- rBMD: 1.3% [1.11-1.60] p=.82; Figura 7a) che di CD16++/CD14+ (HIV- nBMD: 3.8 % [3.2-4] vs HIV- rBMD: 3.3 % [3-3.5] p=.40; Figura 7a). Abbiamo infine deciso di indagare se le frequenze di OCP circolanti correlassero con i parametri di infiammazione che caratterizzano i pazienti HIV+.

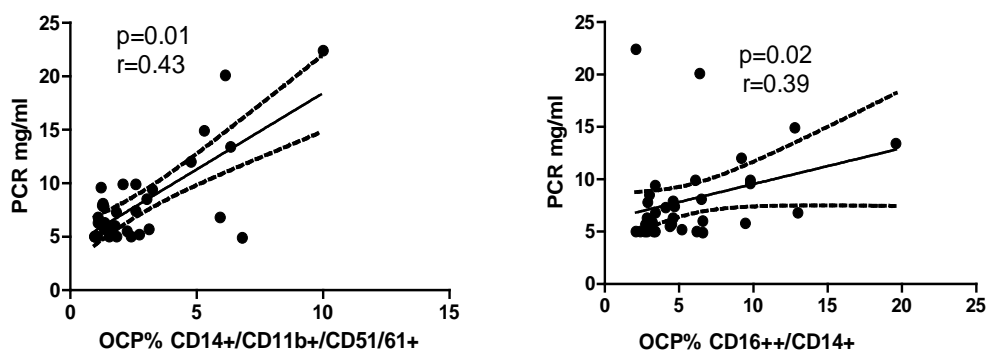
In modo interessante, la proteina C-reattiva (PCR) correla positivamente con la popolazione CD14+/CD11b+/CD51/61+ ($\rho=0.43$, $p=0.01$; Figura 7b) e con la popolazione CD16++/CD14+ ($\rho=0.39$, $p=0.02$; Figura 7b).

Figura 7. OCP circolanti e infiammazione in corso di infezione da HIV.

(a)



(b)



(a) Valutazione della frequenza di cellule CD14+/CD11b+/CD51/61+ e CD16++/CD14+ in HIV- e HIV+ (con e senza BMD ridotta), è stato eseguito un test ANOVA (Kruskal-Wallis) (b) correlazione tra % OCP e PCR.

4.3. I pazienti HIV+ rBMD mostrano una maggiore potenza differenziativa ex-vivo in osteoclasti derivanti da monociti

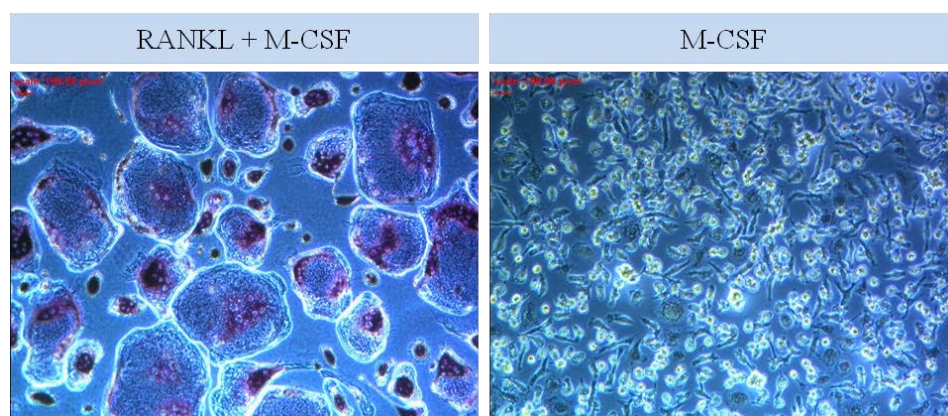
L'osservazione di una aumentata frequenza di OCP circolanti nei pazienti HIV+ ed in particolar modo nei soggetti HIV+ rBMD è stato un dato stimolante. Per tale motivo, abbiamo deciso di approfondire l'aspetto legato alla reale potenza differenziativa in osteoclasti, valutando la formazione *ex vivo* di osteoclasti maturi derivanti da monociti del sangue periferico (Figura 8a).

Nelle colture dei pazienti HIV+ rBMD sono state identificati svariati osteoclasti: cellule giganti multinucleate, positive per la colorazione di TRAP (OC= 42 [38-45]; Figura 8b), al contrario le colture dei pazienti HIV+ nBMD e HIV- presentavano pochi OC differenziati (OC= 26 [25-28]; Figura 8b). L'osteoclastogenesi risultava quindi significativamente aumentata nei pazienti HIV+ rBMD rispetto ai pazienti HIV+ nBMD ($p=.012$; Figura 8b).

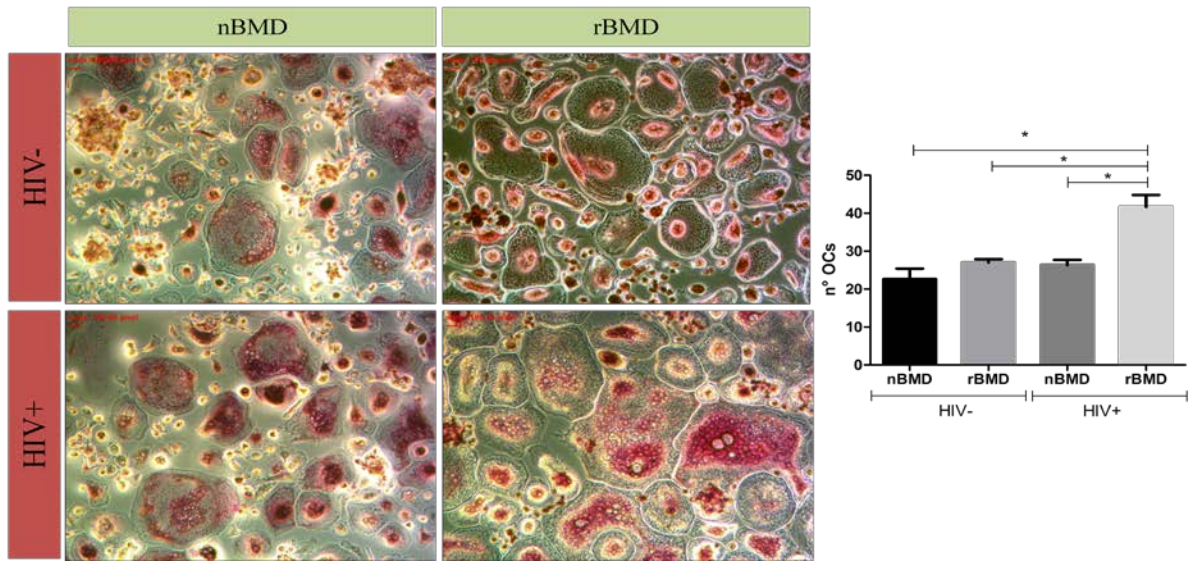
Abbiamo inoltre deciso di indagare la maturità degli osteoclasti differenziati *ex vivo*, valutando la capacità di riassorbire matrice ossea (dentina). Gli osteoclasti ottenuti dopo 8 giorni di differenziamento risultavano in grado di riassorbire la matrice ossea creando dei solchi di riassorbimento (Figura 9).

Figura 8. Differenziazione *ex vivo* di CD14+ in OC

(a)

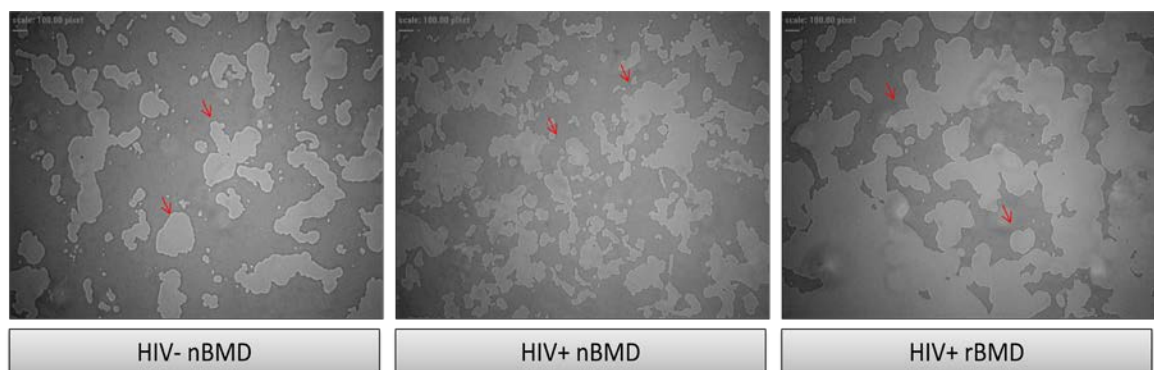


(b)



(a) *CD14+* stimulate con 20ng/ml di M-CSF e 30 ng/ml di RANKL per 7 giorni, si differenziano in OC (a sinistra); *CD14+* trattate solo con 20ng/ml di M-CSF non presentano variazioni nella morfologia (a destra). (b) Incremento della formazione di OC (frecche nere) esprimenti TRAP (rosa), in pazienti HIV+ rBMD vs HIV+ nBMD e HIV-; l'istogramma (a destra) illustra il conteggio di cellule multinucleate e TRAP positive. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard calcolata su tre esperimenti indipendenti.

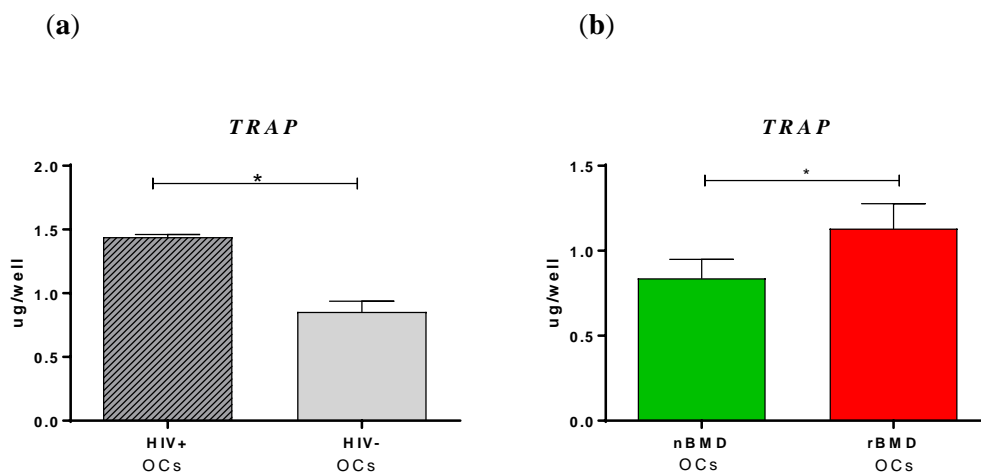
Figura 9. Caratterizzazione ex vivo di OC maturi.



La formazione di solchi (frecche rosse) sulla dentina ossea è stata osservata in tutte le colture dopo la stimolazione con RANKL e M-CSF, suggerendo la differenziazione in OC maturi.

A sostegno dei dati qualitativi ottenuti con la conta degli osteoclasti dopo 8 giorni di differenziamento, è stato quantificato il TRAP delle singole colture. Come atteso, l'analisi ha rilevato differenze significative tra i pazienti HIV+ e HIV-, evidenziando una maggiore produzione di TRAP nei soggetti sieropositivi (HIV+ 1.42 ug/well [1.42 -1.48]; HIV- 0.78ug/well [0.76-1.02] p=.040; Figura 10a). Inoltre, confrontando i pazienti HIV+, rBMD vs nBMD abbiamo riscontrato nei pazienti rBMD un aumento statisticamente significativo nella produzione di TRAP rispetto ai nBMD (nBMD 0.8 ug/well [0.74-0.95]; rBMD 1.1ug/well [1-1.29] p=.038; Figura 10b).

Figura 10. Quantificazione di TRAP in colture cellulari di OC differenziati da monociti (CD14+)

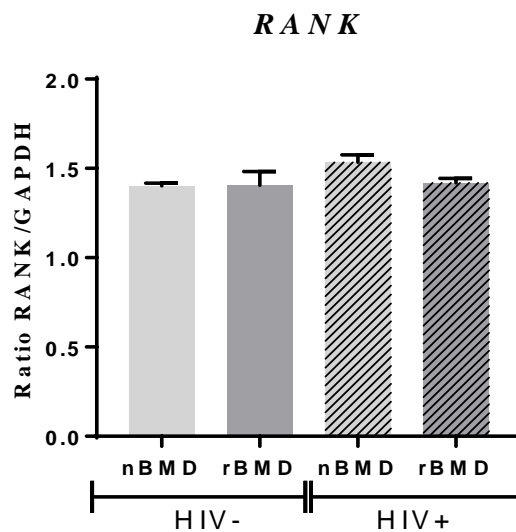


concentrazione di TRAP prodotto da OC maturi (a) OC di pazienti HIV+ presentano una maggiore produzione di TRAP rispetto al gruppo HIV- (b) OC di pazienti con una rBMD esprimono alte concentrazioni di TRAP rispetto ai nBMD; per entrambi è stata eseguita come analisi statistica un two-tailed t-test (Mann-Whitney): *=p<0.05.

4.4. I monociti dei soggetti HIV+ e HIV- non mostrano differenze significative nell'espressione del recettore RANK

Poiché il differenziamento ex vivo in OC è stato ottenuto con l'aggiunta in coltura della citochina RANKL, per confermare che la diversa potenza osteoclastogena tra i gruppi in studio (HIV+ e HIV-), non fosse stata determinata da una differenza nell'espressione del recettore di RANKL, è stato misurato RANK in tutti i monociti dei pazienti arruolati (CD14+). Tuttavia, confrontando i gruppi tra di loro nessuna differenza è stata osservata nei livelli di espressione del recettore RANK (HIV- nBMD $1.39^{\text{RANK/GAPDH}}$ [1.37-1.43]; HIV- rBMD $1.44^{\text{RANK/GAPDH}}$ [1.24-1.52]; HIV+ nBMD $1.54^{\text{RANK/GAPDH}}$ [1.44-1.62]; HIV+ rBMD $1.42^{\text{RANK/GAPDH}}$ [1.37-1.47]; $p=0.1$; Figura 11).

Figura 11. Livelli di espressione genica di RANK.



qRT-PCR su cellule CD14+ dopo selezione negativa da PBMC. I dati sono rappresentati come rapporto tra gene RANK e gene housekeeping (GAPDH); è stato eseguito un test ANOVA (Kruskal-Wallis).

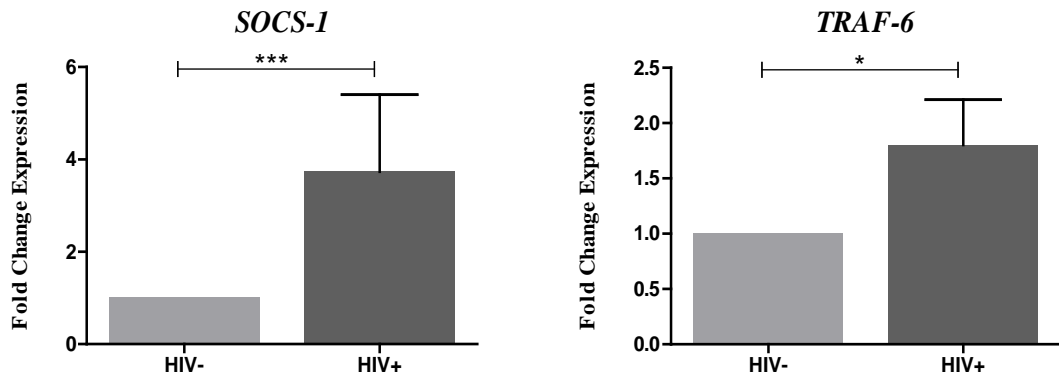
4.5. OC dei pazienti HIV + mostrano una espressione aumentata di SOCS-1 , TRAF-6 e Catepsina K

Sulla base delle osservazioni precedenti, abbiamo deciso di studiare i meccanismi molecolari che potessero guidare il diverso potenziale osteoclastogenico osservato nei pazienti HIV+. Partendo da dati sul ratto HIV transgenico [132], abbiamo ipotizzato che anche nell'uomo l'aumentata attività osteoclastogenica potesse essere dovuta alla overespressione del gene SOCS-1.

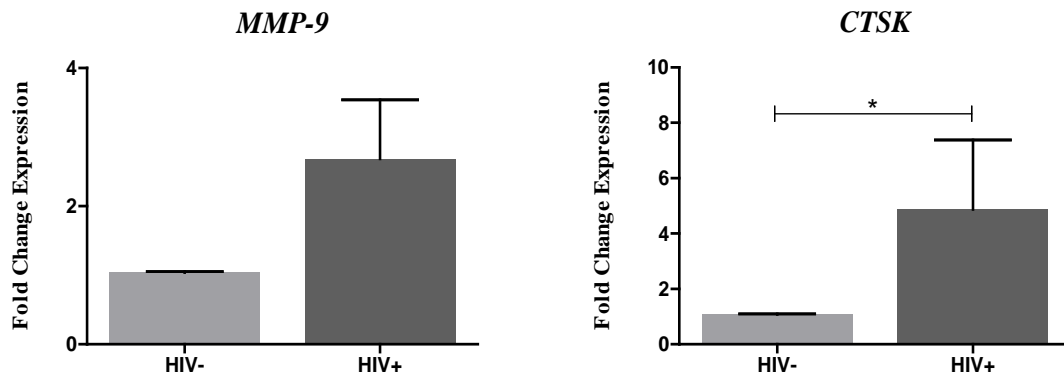
In maniera interessante gli OC dei soggetti HIV+ hanno mostrato livelli di espressione di SOCS-1 mRNA più alti rispetto ai soggetti HIV- (HIV- $1^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [1-1]; HIV+ $1.39^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [1.13-2.44]; $p=.0007$; Figura 12a). Dato il ruolo di SOCS-1 nel regolare TRAF-6, gene a monte della cascata molecolare che porta ad un aumentato riassorbimento osseo, abbiamo deciso di valutarne l'espressione negli OC dei pazienti arruolati. I soggetti HIV+ hanno mostrato una overespressione di TRAF-6 mRNA (HIV- $1^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [1-1]; HIV+ $1.41^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [1-1.92]; $p=.011$; Figura 12a) rispetto al gruppo HIV-. Anche per quanto riguarda i livelli di mRNA della proteasi Catepsina K, gli OC dei soggetti HIV+ si sono caratterizzati per livelli più alti rispetto ai soggetti HIV- (HIV- $1^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [1-1]; HIV+ $2.71^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [0.91-4.83]; $p=.033$; Figura 12b). Al contrario, nessuna differenza è stata osservata nell'espressione del gene della metallo proteasi 9 MMP-9 (HIV- $1^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [1-1]; HIV+ $1.57^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [0.69-4.28]; $p=.96$; Figura 12b).

Figura 12. Valutazione genica di SOCS-1, TRAF-6, MMP-9 e CTSK in OC di HIV+

(a)



(b)



CD14+ di pazienti HIV+ (n=20) e HIV- (n=10) stimulate con 20ng/ml di M-CSF e 30 ng/ml RANKL (a) Gli istogrammi mostrano i livelli di espressione di SOCS-1 (a sinistra) e TRAF-6 (a destra) tra HIV- e HIV+. (b) analisi di espressione genica di MMP-9 e CTSK. Tutti i geni sono stati normalizzati per GAPDH e tra i gruppi è stata eseguita come analisi statistica un two-tailed t-test (Mann-Whitney): *= $p < 0.05$, ***= $p < 0.001$.

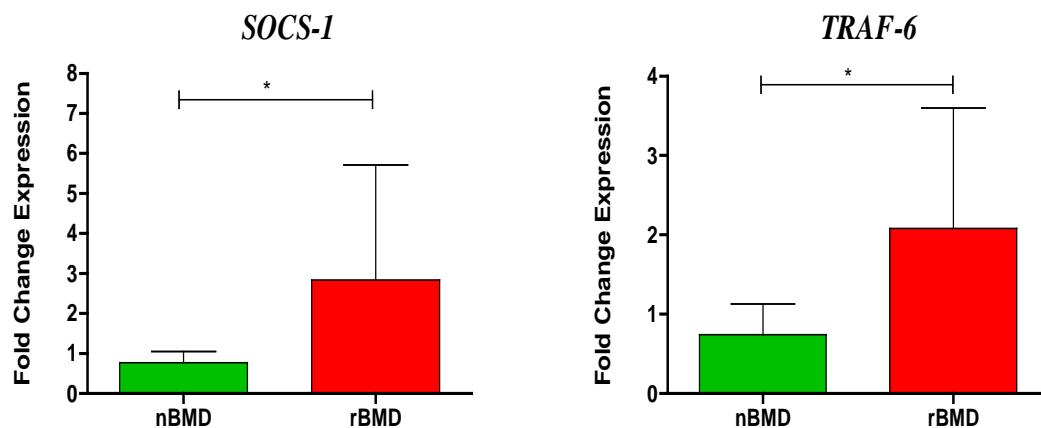
4.6. Disregolazione del pathway SOCS-1/TRAF6 in OC di pazienti HIV+ con ridotta BMD

Le evidenti differenze di espressione genica riscontrate nei macrogruppi HIV+ vs HIV- hanno portato a valutare e approfondire possibili variazioni all'interno dei sottogruppi nBMD e rBMD.

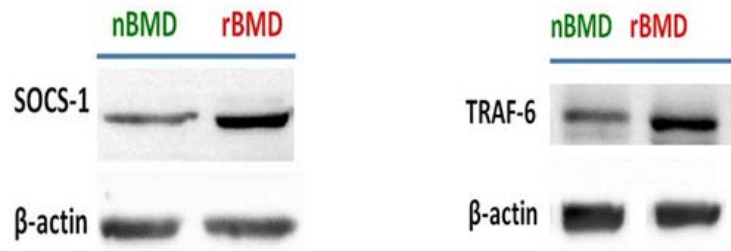
Le prime indagini sui livelli di mRNA di SOCS-1 e TRAF6 sono state condotte in pazienti HIV+, suddivisi in base alla BMD. Inaspettatamente, si osserva una differenza tra OC maturi di soggetti HIV+ con rBMD rispetto ai nBMD. Infatti è presente una up-regolazione di SOCS-1 (HIV+ nBMD $0.75^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [0.58-0.90]; HIV+ rBMD $2.14^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [1.18-3.19]; $p=.027$; Figura 13a) e di TRAF-6 (HIV+ nBMD $0.75^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [0.31-1.16]; HIV+ rBMD $1.65^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [0.79-3.16]; $p=.014$; Figura 13a). Inoltre, questo incremento di espressione rimane presente anche a livello proteico (Figure 13b).

Figura 13. SOCS-1 e TRAF-6 overespressi in OC di HIV+

(a)



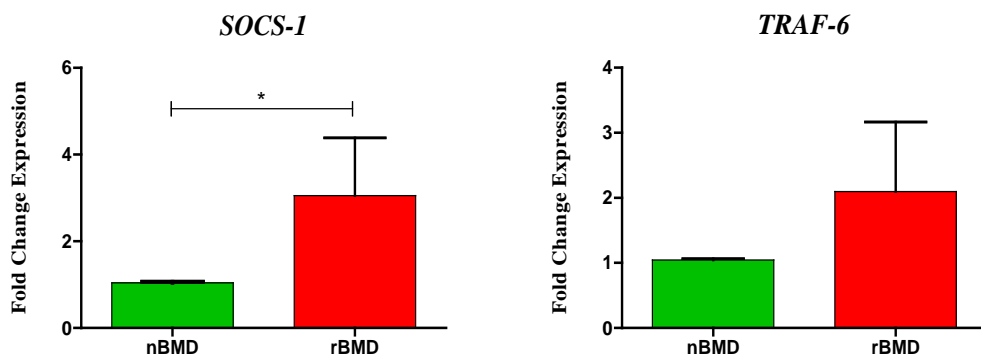
(b)



(a) OC maturi derivanti da PBMC di pazienti HIV+ rBMD (n=10) esprimono livelli elevati di SOCS-1 (a sinistra) e TRAF-6 (a destra). I dati sono stati normalizzati con il gene controllo GAPDH; è stata eseguita come analisi statistica un two-tailed t-test (Mann-Whitney): $*=p<0.05$.
(b) OC di HIV+ rBMD (n=3) e nBMD (n=3). SOCS-1(a sinistra), TRAF-6 (a destra) e β -actina sono stati rilevati tramite Western blotting.

La variazione dei livelli di espressione di SOCS-1 e TRAF-6, in base alla condizione clinica di ridotta BMD, ha portato a valutare questi geni anche in soggetti HIV-. Come riscontrato precedentemente negli HIV+ anche in HIV- è presente un incremento di SOCS-1 in soggetti rBMD rispetto a nBMD (HIV+ rBMD $2.14^{2^{-\Delta\Delta CT}}$ [1.18-3.19]; HIV- nBMD $1^{2^{-\Delta\Delta CT}}$ [1-1]; $p=.021$; Figura 14). Mentre, non si osservano variazioni di TRAF-6 mRNA nei rBMD (HIV+ rBMD $1.65^{2^{-\Delta\Delta CT}}$ [0.80-3.16]; HIV- nBMD $1^{2^{-\Delta\Delta CT}}$ [1-1]; $p=.040$; Figura 14).

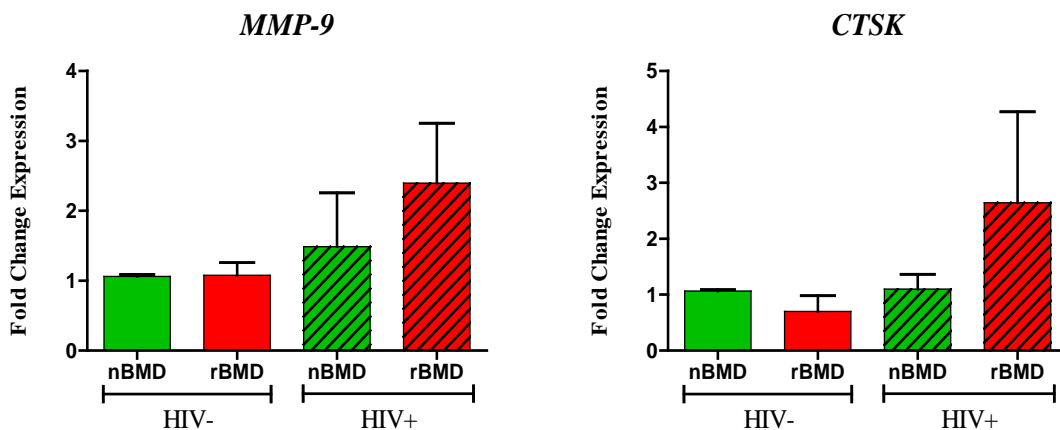
Figura 14. SOCS-1 up-regolato in OC di HIV-



qRT-PCR per SOCS-1 e TRAF-6; tutti i dati sono stati normalizzati con il gene controllo GAPDH e i Fold change sono stati calcolati con il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$; è stata eseguita come analisi statistica un two-tailed t-test (Mann-Whitney): $*=p<0.05$.

A differenza di quanto osservato nei geni SOCS-1 e TRAF-6 le analisi statistiche sui livelli di espressione dei geni a valle del pathway osteoclastogenico, non rilevano differenze dettate dalla riduzione della BMD. Infatti, soggetti HIV- non presentano variazioni significative per MMP-9 (HIV- nBMD $1^{2^{-\Delta\Delta CT}}$ [1-1]; HIV- rBMD $1^{2^{-\Delta\Delta CT}}$ [0.81-1.42]; p=.74; Figura 15) e CTKS (HIV- nBMD $1^{2^{-\Delta\Delta CT}}$ [1-1]; HIV- rBMD $0.65^{2^{-\Delta\Delta CT}}$ [0.22-1.23]; p=.19; Figura 15). Lo stesso andamento si osserva in pazienti HIV+ dove MMP-9 (HIV+ nBMD $0.45^{2^{-\Delta\Delta CT}}$ [0.19-3.48]; HIV+ rBMD $1.99^{2^{-\Delta\Delta CT}}$ [0.54-5.15]; p=.44; Figura 15) e CTKS (HIV+ nBMD $0.94^{2^{-\Delta\Delta CT}}$ [0.59-1.61]; HIV+ rBMD $0.36^{2^{-\Delta\Delta CT}}$ [0.15-6.27]; p=.66; Figura 15) non risultano statisticamente significative.

Figura 15. Livelli di MMP-9 e CTSK mRNA in OC differenziati ex vivo



*qRT-PCR su OC differenziati ex vivo da PBMC di soggetti HIV- (nBMD [n=10]; rBMD [n=5]) e HIV+ (nBMD [n=10]; rBMD [n=10]) per i geni MMP-9 e CTSK; tutti i dati sono stati normalizzati con il gene controllo GAPDH e i Fold change sono stati calcolati con il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$; è stata eseguita come analisi statistica un two-tailed t-test (Mann-Whitney): *=p<0.05.*

4.7. Lo stimolo esogeno con IFN- γ modula il pathway SOCS-1/TRAF-6 in OC differenziati ex-vivo di pazienti HIV+ rBMD

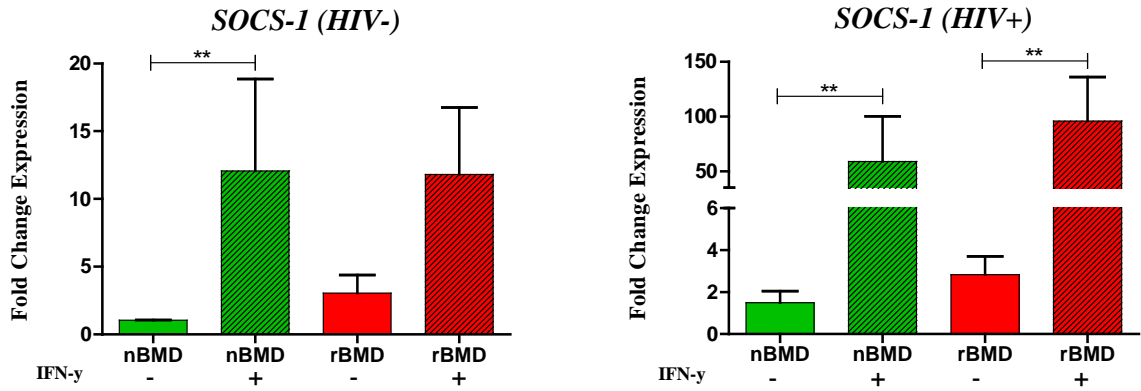
Dato il ruolo essenziale di IFN- γ nell'inibire la cascata osteoclastogenica è stato indagato l'effetto che tale citochina potesse avere sui geni in studio. Per valutare il contributo dell' IFN- γ nell'osteoclastogenesi, gli OC maturi sono stati stimolati o non con 40 IU/ μ l di IFN- γ per 2h. L'espressione dei geni SOCS-1, TRAF6, MMP-9 e CTSK è stata quantificata con real time qRT-PCR. La statistica è stata determinata confrontando i fold change, prima e dopo trattamento con IFN- γ , nello stesso gruppo di pazienti.

Il gruppo HIV- nBMD ha mostrato un aumento dell'espressione di SOCS-1 in seguito a stimolazione con IFN- γ (HIV- nBMD $1.05^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [1-1.10]; HIV- nBMD/IFN- γ $5.76^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [4.77-6.22]; p=.0013; Figura 16a). Analogamente, l'espressione di SOCS-1 nei pazienti HIV+ è risultata aumentata dopo stimolo con IFN- γ sia nella popolazione HIV+ nBMD (HIV+ nBMD $0.80^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [0.60-1.35]; HIV+ nBMD/IFN- γ $7.50^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [2.77-122.3]; p=.0057; Figura 16a) che rBMD (HIV+ nBMD $2.13^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [1.18-3.19] che HIV+ nBMD/IFN- γ $55.84^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [32.50-179.4]; p=.0022; Figura 16a).

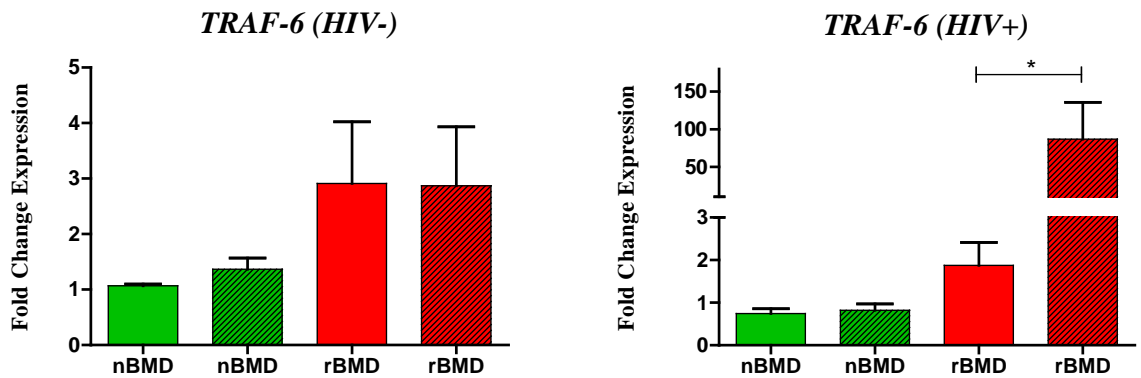
In maniera molto interessante, il trattamento con IFN- γ porta ad una overespressione di TRAF-6 esclusivamente nella popolazione degli HIV+ con rBMD (HIV+ nBMD $1.52^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [0.76-2.82]; HIV+ nBMD/IFN- γ $85.81^{2^{\Delta\Delta CT}}$ [1.43-173]; p=.024; Figura 16b), al contrario nessuna differenza è stata riscontrata nei livelli di espressione del gene in studio in tutti gli altri gruppi (Figura 16b).

Figura 16. Livelli di espressione di SOCS-1 e TRAF-6 dopo stimolo con IFN- γ

(a)



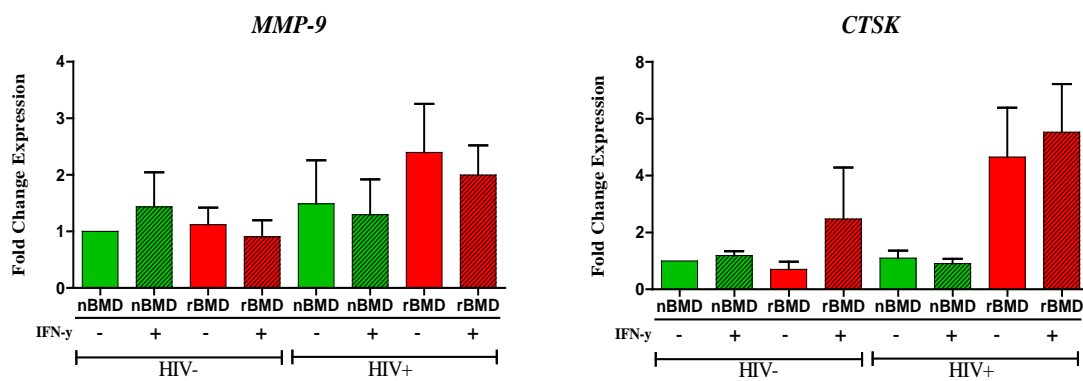
(b)



qRT-PCR per (a) SOCS-1 e (b) TRAF-6 su OC maturi dopo stimolazione per 2h con IFN- γ . Tutti i dati sono stati normalizzati per il gene controllo GAPDH, i Fold change calcolati con il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$; è stata eseguita come analisi statistica un two-tailed t-test (Mann-Whitney): *= $p < 0.05$, ***= $p < 0.001$.

Dopo aver osservato l'effetto di IFN- γ sul gene TRAF-6 a monte del differenziamento osteoclastogenico, è stata valutata l'espressione degli enzimi a valle della cascata del segnale che sono la MMP-9 e CTSK. Lo stimolo con IFN- γ non altera l'espressione di MMP-9 nei diversi gruppi, mentre l'espressione di CTSK risulta aumentata solo nei pazienti HIV+ con rBMD, anche se non raggiunge una significatività statistica (p=.42) (Figura 17).

Figura 17. Livelli di espressione di MMP-9 e CTSK dopo stimolo con IFN- γ



qRT-PCR per MMP-9 e CTSK su OC maturi dopo stimolazione per 2h con IFN- γ . Tutti i dati sono stati normalizzati per il gene controllo GAPDH, i Fold change calcolati con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

4.8. interazione tra infezione da HIV, ridotta BMD e disregolazione genica

Al fine di analizzare l'interazione di IFN- γ , infezione da HIV e danno osseo sull'espressione di SOCS-1, TRAF-6, CTK ed MMP-9 è stata applicata una analisi di covarianza (ANCOVA).

L'overespressione di SOCS-1 risultava essere fortemente associata all'essere HIV+ (aumento della differenza delle medie di 48.81; $p=.001$). In maniera analoga seppur con un effetto meno evidente anche l'essere osteopenico/osteoporotico risultava essere associato all'aumento dell'espressione di SOCS-1 (aumento delle medie di 27.74 volte; $p=.050$) (Tabella 2a). L'analisi di covarianza ha permesso di studiare un possibile effetto interattivo tra le due variabili (HIV+, osteopenia/osteoporosi) sull'espressione di SOCS-1 dopo trattamento con IFN- γ . In maniera molto interessante, questo modello statistico ha evidenziato una sinergia tra le due variabili, facendo emergere un aumento dell'espressione di SOCS-1 nei pazienti HIV+ con danno osseo vs i pazienti HIV+ senza danno osseo (80.21 HIV+ rBMD; 23.45 HIV+ nBMD; $p=.003$) (Tabella 2b).

Tabella 2. Interazione infezione di HIV e ridotta BMD

(a)	<i>Media SOCS-1</i>	<i>Differenza delle medie</i>	<i>p-value</i>
HIV			<.001
negativo	75.09 (51.01-99.18)	0	
positivo	123.9 (104.4-143.4)	48.81 (28.78-63.83)	
BMD			.050
Normale	88.45 (56.16-120.7)	0	
Ridotto	116.2 (92.31-140.1)	27.74 (1.13-54.36)	

(b)	<i>Pazienti con rBMD</i>		<i>Pazienti con nBMD</i>		<i>p-value interazione HIV/BMD</i>
	<i>Media SOCS-1</i>	<i>Differenza delle medie</i>	<i>Media SOCS-1</i>	<i>Differenza delle medie</i>	
HIV					.003
Negativo	55.86 (28.78-82.93)	0	20.90 (-56.5-98.33)	0	
Positivo	136.1 (118.3-153.8)	80.21 (52.66-107.8)	44.35 (-32.9-121.6)	23.45 (3.01-43.89)	

espressione di SOCS-1 in OC maturi di pazienti HIV+ e HIV- con e senza danno osseo. Le espressioni geniche sono presentate come medie e intervalli di confidenza. Analisi statistica di covarianza (ANCOVA).

Le analisi di covarianza sono state applicate anche al gene TRAF-6. L'incremento dei livelli di TRAF-6, dopo stimolo con IFN- γ , risultavano associati all'infezione da HIV (differenza delle medie di 39.69; $p=.026$) e fortemente legati alla riduzione della BMD (differenza delle medie di 59.27; $p=.001$) (Tabella 3a). Inoltre, questo modello statistico ha permesso di dimostrare l'interazione tra le due variabili, evidenziando così più alti livelli di TRAF-6 in pazienti HIV+ con danno osseo vs i pazienti HIV+ senza danno (68.58 HIV+ rBMD; -0.37 HIV+ nBMD; $p=.025$) (Tabella 3b).

Tabella 3. Interazione infezione di HIV e ridotta BMD

(a)	<i>Media TRAF-6</i>	<i>Differenza delle medie</i>	<i>p-value</i>
HIV			.026
Negativo	29.24 (-20.6-79.10)	0	
Positivo	68.93 (16.65-121.2)	39.69 (6.66-72.71)	
BMD			.001
Normale	-21.5 (-78.6-35.55)	0	
Ridotto	37.76 (-6.23-81.75)	59.27 (26.51-92.03)	

(b)	<i>Pazienti con rBMD</i>		<i>Pazienti con nBMD</i>		<i>p-value interazione HIV/BMD</i>
	<i>Media TRAF-6</i>	<i>Differenza delle medie</i>	<i>Media TRAF-6</i>	<i>Differenza delle medie</i>	
HIV					.025
Negativo	7.62 (-61.1-76.30)	0	-2.89 (-6.08-0.31)	0	
Positivo	76.20 (2.69-149.7)	68.58 (-1.27-138.4)	-3.25 (-6.68-138.4)	-0.37 (-0.88-0.15)	

espressione di TRAF-6 in OC maturi di pazienti HIV+ e HIV- con e senza danno osseo. Le espressioni geniche sono presentate come medie e intervalli di confidenza. Analisi statistica di covarianza (ANCOVA).

Tutt'altro si osserva nei geni MMP-9 e CTSK a valle della cascata dell'osteoclastogenesi. MMP-9, in accordo con i dati della qRT-PCR, non presentava associazioni statisticamente significative con l'infezione da HIV ($p=.745$) o la ridotta BMD ($p=.369$) (Tabella 4a-b).

Tabella 4. Interazione infezione di HIV e ridotta BMD

(a)	<i>Media MMP-9</i>	<i>Differenza delle medie</i>	<i>p-value</i>
HIV			.745
Negativo	1.01 (0.15-1.86)	0	
Positivo	1.18 (0.35-2.01)	0.17 (-0.85-1.19)	
BMD			.369
Normale	0.94 (0.20-1.68)	0	
Ridotto	1.41 (0.47-2.34)	0.47 (-0.53-1.47)	

(b)	<i>Pazienti con rBMD</i>		<i>Pazienti con nBMD</i>		<i>p-value interazione HIV/BMD</i>
	<i>Media MMP-9</i>	<i>Differenza delle medie</i>	<i>Media MMP-9</i>	<i>Differenza delle medie</i>	
HIV					.151
negativo	1.10 (-0.05-2.26)	0	0.62 (-0.38-1.62)	0	
positivo	2.55 (1.53-3.57)	1.44 (0.09-2.80)	0.07 (-0.91-1.05)	-0.55 (-1.72-0.62)	

espressione di MMP-9 in OC maturi di pazienti HIV+ e HIV- con e senza danno osseo. Le espressioni geniche sono presentate come medie e intervalli di confidenza. Analisi statistica di covarianza (ANCOVA).

I livelli di espressione di CTSK risultavano essere fortemente associati all'essere osteopenico/osteoporotico (differenza delle medie di 3.20; p=.005). Mentre l'essere HIV+ sembra non influenzare i valori di CTSK (differenza delle medie 1.58; p=.199) (Tabella 5a). Inoltre, non sembra esservi sinergia tra le due variabili (p=.198) (Tabella 5b).

Tabella 5. Interazione infezione di HIV e ridotta BMD

(a)	<i>Media CTSK</i>	<i>Differenza delle medie</i>	<i>p-value</i>
HIV			.199
Negativo	1.30 (-0.51-3.12)	0	
Positivo	2.89 (1.10-4.68)	1.58 (-0.78-3.95)	
BMD			.005
Normale	1 (-0.40-2.41)	0	
Ridotto	4.20 (2.39-6.02)	3.20 (1.13-5.26)	

(b)

	<i>Pazienti con rBMD</i>		<i>Pazienti con nBMD</i>		p-value interazione HIV/BMD
	Media CTSK	<i>Differenza delle medie</i>	Media CTSK	<i>Differenza delle medie</i>	
HIV					.198
negativo	2.41 (-1.67-6.48)	0	0.19 (-0.42-0.81)	0	
positivo	5.50 (2.10-8.90)	3.09 (-2.02-8.21)	0.08 (-0.67-0.84)	-0.11 (-0.63-0.40)	

espressione di CTSK in OC maturi di pazienti HIV+ e HIV- con e senza danno osseo. Le espressioni geniche sono presentate come medie e intervalli di confidenza. Analisi statistica di covarianza (ANCOVA).

5. Discussione

L'introduzione della terapia antiretrovirale (cART) ha drasticamente migliorato sia la durata che la qualità della vita dei pazienti HIV positivi. Nonostante questo, l'allungamento dell'età media dei pazienti HIV positivi ha fatto emergere svariate complicazioni associate all'infezione da HIV. Le due manifestazioni maggiori dell'invecchiamento nella popolazione HIV negativa sono il danneggiamento del comparto osseo e la perdita di immunocompetenza. Per molti aspetti, l'infezione da HIV riassume le condizioni di accelerata senescenza [77] presenti nella popolazione sana. Studi recenti suggeriscono che le cellule immunitarie regolano l'omeostasi ossea e possono causare cambiamenti nella densità minerale ossea (BMD) in corso di condizioni infiammatorie [72, 116, 134]. La presenza di danno osseo nei pazienti affetti da HIV varia dal 22% al 50% per l'osteopenia e dal 3% al 20% per l'osteoporosi [135].

Diversi fattori tra cui l'infezione stessa da HIV, l'attivazione T linfocitaria che ne consegue e la tossicità della terapia antiretrovirale sono stati presi in causa come possibili meccanismi patogenetici; questi fattori coesistono e concorrono nel favorire lo sbilanciamento tra riassorbimento e neoformazione di matrice ossea.

Nonostante il ruolo della terapia antiretrovirale e del sistema immunitario sul metabolismo osseo siano stati ampiamente descritti negli ultimi anni [91, 136], molto rimane ancora da chiarire sui meccanismi molecolari alla base della prematura riduzione della BMD.

Lo scopo dello studio è stato pertanto quello di indagare un possibile meccanismo molecolare patologico alla base dell'insorgenza di osteopenia/osteoporosi, in pazienti HIV positivi in corso di terapia antiretrovirale.

Nel primo obiettivo dello studio ci si proponeva di indagare se vi fosse uno squilibrio nella frequenza dei precursori osteoclastici in circolo in pazienti HIV positivi con danno osseo.

Dai nostri esperimenti è emerso che i pazienti HIV positivi con ridotto BMD si caratterizzano per una elevata frequenza in circolo di precursori osteoclastici, definiti sia come CD14+/CD11b/CD51/61+, che come monociti CD14+/CD16+. Un aumento in circolo di queste popolazioni cellulari è stato ampiamente descritto in diverse patologie legate al danno osseo, come il morbo di Paget, l'artrite psoriasica, e pazienti con danno renale cronico dove la prevalenza di monociti CD14+/CD16+ è stata associata ad alti livelli di infiammazione [53, 137, 138].

L'aspetto più intrigante di questa prima parte dello studio è stata l'osservazione per cui l'aumentata presenza di precursori osteoclastici in circolo si osservava solo per i pazienti HIV positivi con danno osseo e non nei pazienti HIV negativi con ridotto BMD, come già descritto in letteratura [139], rafforzando l'ipotesi del coinvolgimento significativo del virus nell'insorgenza dell'osteopenia/osteoporosi nei pazienti HIV infetti.

In accordo con queste osservazioni, nel nostro lavoro abbiamo inoltre osservato una correlazione positiva tra precursori osteoclastici circolanti ed infiammazione, definita come proteina C reattiva circolante.

Sebbene lo studio non sia stato disegnato per identificare associazioni significative tra danno osseo e marcatori di infiammazione, queste osservazioni indicano una potenziale correlazione tra l'infiammazione in corso di infezione da HIV e l'insorgenza di comorbidità ossea HIV correlata. La nostra ricerca potrebbe rappresentare un punto di partenza per nuovi biomarker da testare in studi più ampi volti ad individuare marcatori precoci di danno osseo in pazienti HIV positivi in corso di cART.

Sarà sicuramente interessante valutare ulteriori marcatori di infiammazione e comprendere al meglio l'associazione con gli OCP circolanti.

Alla luce dei risultati ottenuti, la seconda parte dello studio era volta ad approfondire la potenza differenziativa (*ex-vivo*) dei monociti di pazienti HIV positivi in osteoclasti maturi. Un essenziale marcatore, fortemente studiato per valutare l'attività osteoclastogena, è l'acido fosfatasi tartrato resistente i cui livelli risultano notevolmente modificati in pazienti infetti da HIV e/o pazienti osteoporotici [140]. L'importanza del marcatore TRAP è legata all'attività enzimatica che risulta

direttamente coinvolta nel riassorbimento osseo e nella degradazione del collagene di tipo I [141, 142]. L'ipotesi di partenza del secondo obiettivo era che monociti di pazienti HIV+ , differenziati *ex vivo* e con espressione comparabile del recettore RANK, potessero presentare un numero maggiore di osteoclasti maturi rispetto a monociti differenziati *ex vivo* di soggetti HIV negativi. In modo molto interessante, abbiamo osservato un aumento qualitativo e quantitativo in termini di numero di osteoclasti maturi e produzione di TRAP, nei pazienti HIV+ con ridotta BMD rispetto ai gruppi nBMD e controlli non infetti. Questi dati hanno confermato ulteriormente l'ipotesi che i soggetti HIV positivi con ridotto BMD mostrano una aumentata osteoclastogenesi rispetto ai soggetti sani, ma in modo interessante anche rispetto ai soggetti HIV negativi con osteopenia/osteoporosi.

Inoltre, seppure con la limitazione di essere un modello *ex vivo*, monociti CD14+, differenziati in osteoclasti maturi, in grado di riassorbire e produrre TRAP, costituiscono un ottimo modello sperimentale per indagare i meccanismi patologici alla base della precoce insorgenza di osteopenia/osteoporosi nella popolazione HIV+. Infatti la messa a punto di questo modello è stato il punto di partenza per lo sviluppo dell'ultima parte del progetto , ovvero lo studio molecolare su osteoclasti maturi per l'identificazione di un meccanismo patologico alla base dell'insorgenza della comorbidity ossea in pazienti HIV positivi in corso di terapia antiretrovirale. Studi su OC di ratti transgenici HIV positivi hanno dimostrato come l'up-regolazione del gene SOCS-1 possa indurre una disregolazione di TRAF-6, portando ad un'aumentata osteoclastogenesi [132, 133]. Analogamente a quanto descritto in letteratura [132], abbiamo osservato una over-espressione di SOCS-1 in OC di pazienti HIV positivi rispetto ai controlli HIV negativi, sia a livello genico che proteico. Questi risultati sono in accordo con lo studio di Yadav et al., che hanno evidenziato alti livelli circolanti di SOCS-1 in pazienti HIV+ [133]. Il nostro studio ha inoltre riportato una over-espressione del gene TRAF-6 nelle colture *ex-vivo* di OC di pazienti HIV+ rBMD, supportando l'ipotesi di un coinvolgimento diretto/indiretto di SOCS-1 nel modificare la via di attivazione dell'osteoclastogenesi tramite la regolazione di TRAF-6. Per tale motivo abbiamo deciso di testare alcuni enzimi a valle della cascata osteoclastogenica: CTSK e MMP-9. Entrambi i geni sono

espressi da OC maturi e sono considerati ottimi marcatori per definire l'attività degli osteoclasti [143]. Mentre, gli alti valori di CTSK in pazienti HIV+ con danno osseo confermano i dati osservati sul gene TRAF-6, non si osservano variazioni di MMP-9. Tale discrepanza nei livelli di espressione potrebbe in parte essere ascritta ai diversi tempi di espressione, di tali enzimi, nel differenziamento e al ruolo predominante di CTSK nella fase di riassorbimento osseo [144]. Il rinnovato interesse scientifico degli ultimi anni sull'importanza dell'interazione tra sistema immunitario e sistema scheletrico, ha evidenziato il ruolo cruciale di IFN- γ sul metabolismo osseo [71, 73, 132]. E' stato descritto che IFN- γ interferisce con l'osteoclastogenesi RANKL mediata e tale meccanismo è cruciale per la soppressione del riassorbimento osseo. Infatti, l'inibizione dell'osteoclastogenesi mediata da IFN- γ avviene attraverso la degradazione di TRAF-6, da un sistema ubiquitina/proteosoma, impedendo così l'attivazione dei geni NF κ B [71].

A tal proposito, è stato valutato l'effetto di IFN- γ su i due geni target SOCS-1 e TRAF-6 in OC di pazienti HIV+ differenziati *ex vivo*. La prima osservazione ottenuta grazie ad un test statistico di interazione sull'espressione di SOCS-1 e TRAF-6, è che l'up-regolazione di SOCS-1 e TRAF-6 dopo stimolo con IFN- γ è fortemente associata all'infezione da HIV e all'essere osteoporotico/osteopenico.

Contrariamente a quanto descritto in letteratura [144] l'aumento di CTSK sembra essere correlato solo all'essere osteopenico /osteoporotico e non alla presenza o meno del virus HIV. A parziale spiegazione di ciò va detto che la correlazione tra aumento di CTSK ed essere HIV si perde nell'analisi di covarianza, forse per la necessità di un campione statistico maggiore, ma è presente nel confronto diretto tra HIV negativi e HIV positivi ($p=.033$).

Nel nostro modello patogenetico (Figura 18), l'induzione di SOCS-1 negli OC di pazienti HIV+ con danno osseo differenziati *ex vivo* è in grado di inibire il signalling di IFN- γ , portando ad un aumento di TRAF-6 e quindi ad un aumento dell'attività osteoclastogenica.

In conclusione, questo studio ha messo in evidenza che i pazienti HIV+ rBMD mostrano una maggiore frequenza di OCP circolanti e OC differenziati ex vivo, indicando una maggiore osteoclastogenesi nei pazienti HIV+ osteopenici/osteoporotici in corso di terapia antiretrovirale, possibilmente correlabile ad elevati livelli di infiammazione sistemica. Inoltre, sembra emergere una vera e propria relazione tra elevati livelli di SOCS-1/TRAF-6 e ridotto BMD, sebbene siano necessari ulteriori studi disegnati specificatamente per indagare l'effettivo rapporto tra questi due fenomeni. L'aumento dell'espressione di SOCS-1/TRAF-6 in OC maturi di pazienti con rBMD suggeriscono un ruolo importante di SOCS-1 nella promozione della differenziazione degli osteoclasti e nell'antagonizzare l'effetto inibitorio dell' IFN- γ sull'osteoclastogenesi.

Sicuramente il proseguimento di questo studio comprenderà esperimenti in grado di capire i fattori scatenanti l'overespressione di SOCS-1 e i cambiamenti nell'attivazione del proteosoma, in uno stato di infezione cronica da HIV. E' indubbio che poter bloccare questo meccanismo, potrebbe ridurre l'attivazione dell'unità di rimodellamento osseo, avendo un effetto diretto ed indiretto sul differenziamento dei monociti in osteoclasti maturi.

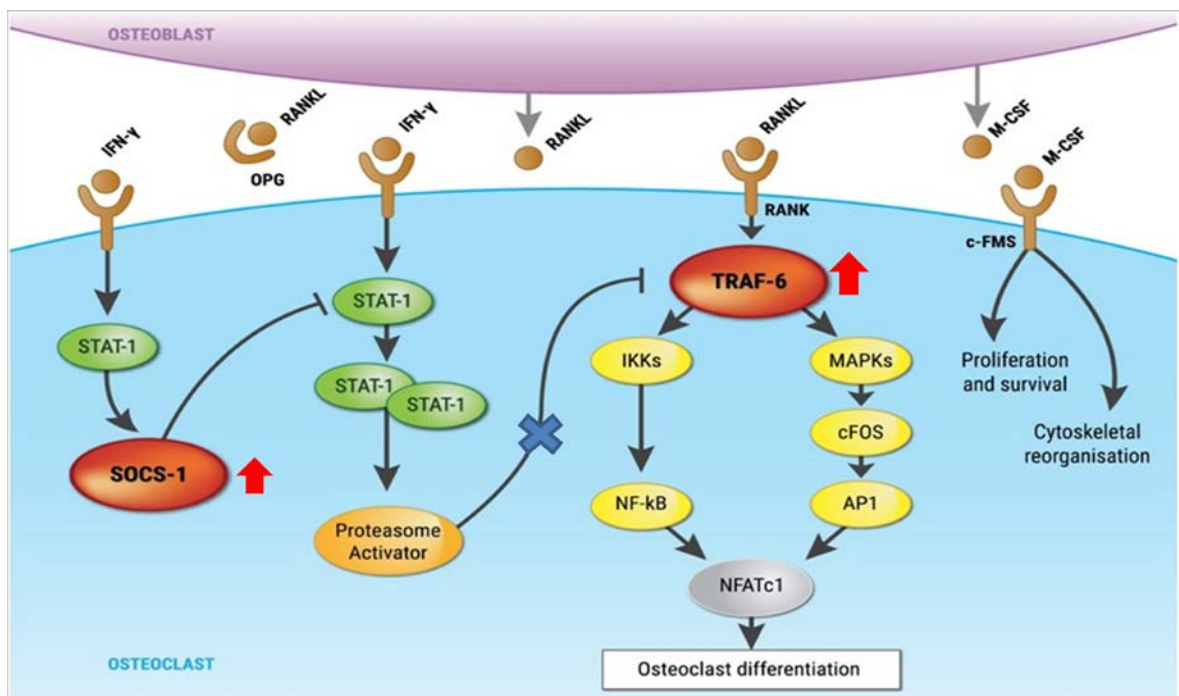


Figura 18. Pathway patologico in pazienti HIV+ con rBMD

Bibliografia

1. Guaraldi G, Cossarizza A, Franceschi C, Roverato A, Vaccher E, Tambussi G, Garlassi E, Menozzi M, Mussini C, D'arminio Monforte A: **Life expectancy in the immune recovery era: the evolving scenario of the HIV epidemic in northern Italy.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2014, **65**:175-181.
2. d'Arminio Monforte A, Sabin CA, Phillips A, Sterne J, May M, Justice A, Dabis F, Grabar S, Ledergerber B, Gill J, et al: **The changing incidence of AIDS events in patients receiving highly active antiretroviral therapy.** *Arch Intern Med* 2005, **165**:416-423.
3. Neuhaus J, Jacobs DR, Baker JV, Calmy A, Duprez D, La Rosa A, Kuller LH, Pett SL, Ristola M, Ross MJ, et al: **Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection.** *J Infect Dis* 2010, **201**:1788-1795.
4. Deeks SG: **Immune dysfunction, inflammation, and accelerated aging in patients on antiretroviral therapy.** *Top HIV Med* 2009, **17**:118-123.
5. Desai S, Landay A: **Early immune senescence in HIV disease.** *Curr HIV/AIDS Rep* 2010, **7**:4-10.
6. Guaraldi G, Orlando G, Zona S, Menozzi M, Carli F, Garlassi E, Berti A, Rossi E, Roverato A, Palella F: **Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population.** *Clin Infect Dis* 2011, **53**:1120-1126.
7. Obel N, Thomsen HF, Kronborg G, Larsen CS, Hildebrandt PR, Sørensen HT, Gerstoft J: **Ischemic heart disease in HIV-infected and HIV-uninfected individuals: a population-based cohort study.** *Clin Infect Dis* 2007, **44**:1625-1631.
8. Hruz PW: **Molecular mechanisms for insulin resistance in treated HIV-infection.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011, **25**:459-468.

9. Brown TT, Qaqish RB: **Response to Berg et al. 'Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review'**. *AIDS* 2007, **21**:1830-1831.
10. Brodsky B, Persikov AV: **Molecular structure of the collagen triple helix**. *Adv Protein Chem* 2005, **70**:301-339.
11. Amizuka N: **[Bone quality in the respect of bone matrix]**. *Clin Calcium* 2004, **14**:589-593.
12. Delaisse JM: **The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation**. *Bonekey Rep* 2014, **3**:561.
13. Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda KH, Miyauchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, Miyamoto H, Yoshida S, Sato Y, Morioka H, et al: **MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner**. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **383**:373-377.
14. Kim MS, Day CJ, Morrison NA: **MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation**. *J Biol Chem* 2005, **280**:16163-16169.
15. Matsuo K, Irie N: **Osteoclast-osteoblast communication**. *Arch Biochem Biophys* 2008, **473**:201-209.
16. Chen G, Deng C, Li YP: **TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation**. *Int J Biol Sci* 2012, **8**:272-288.
17. Matsuo K, Otaki N: **Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases**. *Cell Adh Migr* 2012, **6**:148-156.
18. Robling AG, Castillo AB, Turner CH: **Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling**. *Annu Rev Biomed Eng* 2006, **8**:455-498.
19. Robin CH: **Sur l'existence de deux espèces nouvelles d'éléments anatomiques quise trouvent dans le canal médullaire des os**. *Soc Biol* 1849, **1**:49.
20. Kölliker A: **Die normale Resorption des Knochengewebes und ihre Bedeutung für die Entstehung der typischen Knochenformen**. 1873.
21. Gonzales F, Karnovsky M: **Electron microscopy of osteoclasts in healing fractures of rat bone**. *J Biophys Biochem Cytol* 1961, **9**:299-316.

22. Young RW: **Cell proliferation and specialization during endochondral osteogenesis in young rats.** *The Journal of cell biology* 1962, **14**:357-370.
23. Roodman GD: **Regulation of Osteoclast Differentiation.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, **1068**:100-109.
24. Faccio R, Takeshita S, Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL: **c-Fms and the alphavbeta3 integrin collaborate during osteoclast differentiation.** *J Clin Invest* 2003, **111**:749-758.
25. Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Koide N, Naiki Y, Yoshida T, Yokochi T: **Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells via augmented production of macrophage-colony-stimulating factor.** *Microbiol Immunol* 2008, **52**:585-590.
26. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD: **The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene.** *Nature* 1990, **345**:442-444.
27. Wiktor-Jedrzejczak W, Urbanowska E, Szperl M: **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor corrects macrophage deficiencies, but not osteopetrosis, in the colony-stimulating factor-1-deficient op/op mouse.** *Endocrinology* 1994, **134**:1932-1935.
28. Yao GQ, Sun BH, Weir EC, Insogna KL: **A role for cell-surface CSF-1 in osteoblast-mediated osteoclastogenesis.** *Calcif Tissue Int* 2002, **70**:339-346.
29. Kim JH, Kim N: **Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation.** *Chonnam Med J* 2016, **52**:12-17.
30. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, et al: **Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression.** *Nat Med* 2011, **17**:1231-1234.
31. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, et al: **Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts.** *Dev Cell* 2002, **3**:889-901.

32. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, et al: **Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation.** *Cell* 1998, **93**:165-176.
33. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, et al: **RANK is essential for osteoclast and lymph node development.** *Genes Dev* 1999, **13**:2412-2424.
34. McHugh KP, Hovalala-Dilke K, Zheng MH, Namba N, Lam J, Novack D, Feng X, Ross FP, Hynes RO, Teitelbaum SL: **Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts.** *J Clin Invest* 2000, **105**:433-440.
35. Salter DM, Robb JE, Wright MO: **Electrophysiological responses of human bone cells to mechanical stimulation: evidence for specific integrin function in mechanotransduction.** *J Bone Miner Res* 1997, **12**:1133-1141.
36. Pierschbacher MD, Ruoslahti E: **Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule.** *Nature* 1984, **309**:30-33.
37. Lawler J, Weinstein R, Hynes RO: **Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors.** *J Cell Biol* 1988, **107**:2351-2361.
38. Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield EM, Teti A, Grano M, Colucci S, Zambonin-Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL, Cheresch D: **Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts.** *J Biol Chem* 1991, **266**:20369-20374.
39. Peruzzi B, Teti A. pp. 71-97. *Bone Miner. Metab*; 2012:71-97.
40. Destaing O, Saltel F, Géminard JC, Jurdic P, Bard F: **Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein.** *Mol Biol Cell* 2003, **14**:407-416.
41. Novack DV, Faccio R: **Osteoclast motility: putting the brakes on bone resorption.** *Ageing Res Rev* 2011, **10**:54-61.
42. Zaidi M, Troen B, Moonga BS, Abe E: **Cathepsin K, osteoclastic resorption, and osteoporosis therapy.** *J Bone Miner Res* 2001, **16**:1747-1749.

43. Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A: **The Great Beauty of the osteoclast.** *Arch Biochem Biophys* 2014, **558**:70-78.
44. Andersen TL, del Carmen Ovejero M, Kirkegaard T, Lenhard T, Foged NT, Delaissé JM: **A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells.** *Bone* 2004, **35**:1107-1119.
45. Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M: **Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption.** *Lab Invest* 1995, **72**:311-322.
46. Colnot C, Thompson Z, Mclau T, Werb Z, Helms JA: **Altered fracture repair in the absence of MMP-9.** *Development* 2003, **130**:4123-4133.
47. Kim K, Punj V, Kim JM, Lee S, Ulmer TS, Lu W, Rice JC, An W: **MMP-9 facilitates selective proteolysis of the histone H3 tail at genes necessary for proficient osteoclastogenesis.** *Genes Dev* 2016, **30**:208-219.
48. Mosig RA, Dowling O, DiFeo A, Ramirez MC, Parker IC, Abe E, Diouri J, Aqeel AA, Wylie JD, Olander SA, et al: **Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth.** *Hum Mol Genet* 2007, **16**:1113-1123.
49. Nakamura H, Sato G, Hirata A, Yamamoto T: **Immunolocalization of matrix metalloproteinase-13 on bone surface under osteoclasts in rat tibia.** *Bone* 2004, **34**:48-56.
50. Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM: **Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis.** *J Clin Invest* 2003, **111**:821-831.
51. Mandl M, Schmitz S, Weber C, Hristov M: **Characterization of the CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte population in human bone marrow.** *PLoS One* 2014, **9**:e112140.
52. Roato I, Porta F, Mussa A, D'Amico L, Fiore L, Garelli D, Spada M, Ferracini R: **Bone impairment in phenylketonuria is characterized by circulating osteoclast precursors and activated T cell increase.** *PLoS One* 2010, **5**:e14167.

53. Chiu YG, Shao T, Feng C, Mensah KA, Thullen M, Schwarz EM, Ritchlin CT: **CD16 (FcRgammaIII) as a potential marker of osteoclast precursors in psoriatic arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**:R14.
54. Koch S, Kucharzik T, Heidemann J, Nusrat A, Luegering A: **Investigating the role of proinflammatory CD16+ monocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.** *Clin Exp Immunol* 2010, **161**:332-341.
55. Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J: **Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10.** *Scand J Immunol* 2008, **67**:152-159.
56. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H: **CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**:2578-2586.
57. Shalhoub V, Elliott G, Chiu L, Manoukian R, Kelley M, Hawkins N, Davy E, Shimamoto G, Beck J, Kaufman SA, et al: **Characterization of osteoclast precursors in human blood.** *Br J Haematol* 2000, **111**:501-512.
58. Boyce BF, Xing L: **Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling.** *Arch Biochem Biophys* 2008, **473**:139-146.
59. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K: **Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **234**:137-142.
60. Khosla S: **Minireview: the OPG/RANKL/RANK system.** *Endocrinology* 2001, **142**:5050-5055.
61. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, et al: **osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification.** *Genes Dev* 1998, **12**:1260-1268.
62. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L: **A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function.** *Nature* 1997, **390**:175-179.

63. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, et al: **Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.** *Cell* 1997, **89**:309-319.
64. Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB: **Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase.** *J Biol Chem* 1998, **273**:20551-20555.
65. Darnay BG, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB: **Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif.** *J Biol Chem* 1999, **274**:7724-7731.
66. Hayden MS, Ghosh S: **Shared principles in NF-kappaB signaling.** *Cell* 2008, **132**:344-362.
67. Anusaksathien O, Laplace C, Li X, Ren Y, Peng L, Goldring SR, Galson DL: **Tissue-specific and ubiquitous promoters direct the expression of alternatively spliced transcripts from the calcitonin receptor gene.** *J Biol Chem* 2001, **276**:22663-22674.
68. Böhm C, Hayer S, Kilian A, Zaiss MM, Finger S, Hess A, Engelke K, Kollias G, Krönke G, Zwerina J, et al: **The alpha-isoform of p38 MAPK specifically regulates arthritic bone loss.** *J Immunol* 2009, **183**:5938-5947.
69. Bakiri L, Takada Y, Radolf M, Eferl R, Yaniv M, Wagner EF, Matsuo K: **Role of heterodimerization of c-Fos and Fra1 proteins in osteoclast differentiation.** *Bone* 2007, **40**:867-875.
70. Li X, Udagawa N, Itoh K, Suda K, Murase Y, Nishihara T, Suda T, Takahashi N: **p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function.** *Endocrinology* 2002, **143**:3105-3113.
71. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, et al: **T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma.** *Nature* 2000, **408**:600-605.

72. Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, Weitzmann MN, Pacifici R: **IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation.** *J Clin Invest* 2007, **117**:122-132.
73. Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M, Huang S, Billiau A, Matthys P: **Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice.** *J Immunol* 1997, **158**:5507-5513.
74. Kamolmatyakul S, Chen W, Li YP: **Interferon-gamma down-regulates gene expression of cathepsin K in osteoclasts and inhibits osteoclast formation.** *J Dent Res* 2001, **80**:351-355.
75. Borderi M, Gibellini D, Vescini F, De Crignis E, Cimatti L, Biagetti C, Tampellini L, Re MC: **Metabolic bone disease in HIV infection.** *AIDS* 2009, **23**:1297-1310.
76. Walker Harris V, Brown TT: **Bone loss in the HIV-infected patient: evidence, clinical implications, and treatment strategies.** *J Infect Dis* 2012, **205 Suppl 3**:S391-398.
77. Deeks SG, Phillips AN: **HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity.** *BMJ* 2009, **338**:a3172.
78. Womack JA, Goulet JL, Gibert C, Brandt C, Chang CC, Gulanski B, Fraenkel L, Mattocks K, Rimland D, Rodriguez-Barradas MC, et al: **Increased risk of fragility fractures among HIV infected compared to uninfected male veterans.** *PLoS One* 2011, **6**:e17217.
79. Brown TT, Qaqish RB: **Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review.** *AIDS* 2006, **20**:2165-2174.
80. Dolan SE, Kanter JR, Grinspoon S: **Longitudinal analysis of bone density in human immunodeficiency virus-infected women.** *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91**:2938-2945.
81. Cazanave C, Dupon M, Lavignolle-Aurillac V, Barthe N, Lawson-Ayayi S, Mehzen N, Mercié P, Morlat P, Thiébaud R, Dabis F, Aquitaine GdECdSe: **Reduced bone mineral density in HIV-infected patients: prevalence and associated factors.** *AIDS* 2008, **22**:395-402.
82. Brown TT, McComsey GA, King MS, Qaqish RB, Bernstein BM, da Silva BA: **Loss of bone mineral density after antiretroviral therapy initiation,**

- independent of antiretroviral regimen. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009, 51:554-561.**
83. Duvivier C, Kolta S, Assoumou L, Ghosn J, Rozenberg S, Murphy RL, Katlama C, Costagliola D, group AHs: **Greater decrease in bone mineral density with protease inhibitor regimens compared with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor regimens in HIV-1 infected naive patients. *AIDS* 2009, 23:817-824.**
84. Gibellini D, De Crignis E, Ponti C, Cimatti L, Borderi M, Tschon M, Giardino R, Re MC: **HIV-1 triggers apoptosis in primary osteoblasts and HOBIT cells through TNFalpha activation. *J Med Virol* 2008, 80:1507-1514.**
85. Cotter EJ, Ip HS, Powderly WG, Doran PP: **Mechanism of HIV protein induced modulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *BMC Musculoskelet Disord* 2008, 9:33.**
86. Cotter EJ, Mallon PW, Doran PP: **Is PPARγ a prospective player in HIV-1-associated bone disease? *PPAR Res* 2009, 2009:421376.**
87. Cotter EJ, Malizia AP, Chew N, Powderly WG, Doran PP: **HIV proteins regulate bone marker secretion and transcription factor activity in cultured human osteoblasts with consequent potential implications for osteoblast function and development. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007, 23:1521-1530.**
88. Gibellini D, De Crignis E, Ponti C, Borderi M, Clò A, Miserocchi A, Viale P, Re MC: **HIV-1 Tat protein enhances RANKL/M-CSF-mediated osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 401:429-434.**
89. Wang J, Roderiquez G, Oravec T, Norcross MA: **Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. *J Virol* 1998, 72:7642-7647.**
90. Haine V, Fischer-Smith T, Rappaport J: **Macrophage colony-stimulating factor in the pathogenesis of HIV infection: potential target for therapeutic intervention. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006, 1:32-40.**
91. Ofotokun I, Titanji K, Vunna A, Roser-Page S, Vikulina T, Villinger F, Rogers K, Sheth AN, Lahiri CD, Lennox JL, Weitzmann MN: **Antiretroviral therapy induces a rapid increase in bone resorption that is positively associated with**

- the magnitude of immune reconstitution in HIV infection. *AIDS* 2016, 30:405-414.**
92. Gibellini D, Borderi M, De Crignis E, Cicola R, Vescini F, Caudarella R, Chiodo F, Re MC: **RANKL/OPG/TRAIL plasma levels and bone mass loss evaluation in antiretroviral naive HIV-1-positive men. *J Med Virol* 2007, 79:1446-1454.**
93. Grant PM, Kitch D, McComsey GA, Dube MP, Haubrich R, Huang J, Riddler S, Tebas P, Zolopa AR, Collier AC, Brown TT: **Low baseline CD4+ count is associated with greater bone mineral density loss after antiretroviral therapy initiation. *Clin Infect Dis* 2013, 57:1483-1488.**
94. Yong MK, Elliott JH, Woolley IJ, Hoy JF: **Low CD4 count is associated with an increased risk of fragility fracture in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011, 57:205-210.**
95. Young B, Dao CN, Buchacz K, Baker R, Brooks JT, Investigators HOSH: **Increased rates of bone fracture among HIV-infected persons in the HIV Outpatient Study (HOPS) compared with the US general population, 2000-2006. *Clin Infect Dis* 2011, 52:1061-1068.**
96. Ofotokun I, Titanji K, Vikulina T, Roser-Page S, Yamaguchi M, Zayzafoon M, Williams IR, Weitzmann MN: **Role of T-cell reconstitution in HIV-1 antiretroviral therapy-induced bone loss. *Nat Commun* 2015, 6:8282.**
97. Pan G, Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM: **AZT enhances osteoclastogenesis and bone loss. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004, 20:608-620.**
98. Moore AL, Vashisht A, Sabin CA, Mocroft A, Madge S, Phillips AN, Studd JW, Johnson MA: **Reduced bone mineral density in HIV-positive individuals. *AIDS* 2001, 15:1731-1733.**
99. Harris M: **Nephrotoxicity associated with antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *Expert Opin Drug Saf* 2008, 7:389-400.**
100. Gallant JE, Staszewski S, Pozniak AL, DeJesus E, Suleiman JM, Miller MD, Coakley DF, Lu B, Toole JJ, Cheng AK, Group S: **Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naive patients: a 3-year randomized trial. *JAMA* 2004, 292:191-201.**

101. Cozzolino M, Vidal M, Arcidiacono MV, Tebas P, Yarasheski KE, Dusso AS: **HIV-protease inhibitors impair vitamin D bioactivation to 1,25-dihydroxyvitamin D.** *AIDS* 2003, **17**:513-520.
102. Vescini F, Cozzi-Lepri A, Borderi M, Re MC, Maggiolo F, De Luca A, Cassola G, Vullo V, Carosi G, Antinori A, et al: **Prevalence of hypovitaminosis D and factors associated with vitamin D deficiency and morbidity among HIV-infected patients enrolled in a large Italian cohort.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011, **58**:163-172.
103. Fakruddin JM, Laurence J: **HIV envelope gp120-mediated regulation of osteoclastogenesis via receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) secretion and its modulation by certain HIV protease inhibitors through interferon-gamma/RANKL cross-talk.** *J Biol Chem* 2003, **278**:48251-48258.
104. Malizia AP, Cotter E, Chew N, Powderly WG, Doran PP: **HIV protease inhibitors selectively induce gene expression alterations associated with reduced calcium deposition in primary human osteoblasts.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007, **23**:243-250.
105. Brown TT, Moser C, Currier JS, Ribaud HJ, Rothenberg J, Kelesidis T, Yang O, Dubé MP, Murphy RL, Stein JH, McComsey GA: **Changes in Bone Mineral Density After Initiation of Antiretroviral Treatment With Tenofovir Disoproxil Fumarate/Emtricitabine Plus Atazanavir/Ritonavir, Darunavir/Ritonavir, or Raltegravir.** *J Infect Dis* 2015, **212**:1241-1249.
106. Martínez E, Larrousse M, Llibre JM, Gutiérrez F, Saumoy M, Antela A, Knobel H, Murillas J, Berenguer J, Pich J, et al: **Substitution of raltegravir for ritonavir-boosted protease inhibitors in HIV-infected patients: the SPIRAL study.** *AIDS* 2010, **24**:1697-1707.
107. Tebas P, Kumar P, Hicks C, Granier C, Wynne B, Min S, Pappa K: **Greater change in bone turnover markers for efavirenz/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate versus dolutegravir + abacavir/lamivudine in antiretroviral therapy-naive adults over 144 weeks.** *AIDS* 2015, **29**:2459-2464.
108. Sax PE, Wohl D, Yin MT, Post F, DeJesus E, Saag M, Pozniak A, Thompson M, Podzamczar D, Molina JM, et al: **Tenofovir alafenamide versus tenofovir**

- disoproxil fumarate, coformulated with elvitegravir, cobicistat, and emtricitabine, for initial treatment of HIV-1 infection: two randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trials.** *Lancet* 2015, **385**:2606-2615.
109. Funderburg NT, McComsey GA, Kulkarni M, Bannerman T, Mantini J, Thornton B, Liu HC, Zhang Y, Song Q, Fang L, et al: **Equivalent Decline in Inflammation Markers with Tenofovir Disoproxil Fumarate vs. Tenofovir Alafenamide.** *EBioMedicine* 2016, **13**:321-327.
 110. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, et al: **Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection.** *Nat Med* 2006, **12**:1365-1371.
 111. Marchetti G, Tincati C, Silvestri G: **Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS.** *Clin Microbiol Rev* 2013, **26**:2-18.
 112. Abu-Amer Y, Ross FP, Edwards J, Teitelbaum SL: **Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its P55 receptor.** *J Clin Invest* 1997, **100**:1557-1565.
 113. Zou W, Bar-Shavit Z: **Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide.** *J Bone Miner Res* 2002, **17**:1211-1218.
 114. Bernardino JJ, Mocroft A, Mallon PW, Wallet C, Gerstoft J, Russell C, Reiss P, Katlama C, De Wit S, Richert L, et al: **Bone mineral density and inflammatory and bone biomarkers after darunavir-ritonavir combined with either raltegravir or tenofovir-emtricitabine in antiretroviral-naive adults with HIV-1: a substudy of the NEAT001/ANRS143 randomised trial.** *Lancet HIV* 2015, **2**:e464-473.
 115. Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK, Schwartz SM, Pascual V, Hood LE, Clark EA: **OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40.** *J Immunol* 1998, **161**:6113-6121.
 116. Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian WP, Weitzmann MN: **B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo.** *Blood* 2007, **109**:3839-3848.

117. Lopez-Granados E, Temmerman ST, Wu L, Reynolds JC, Follmann D, Liu S, Nelson DL, Rauch F, Jain A: **Osteopenia in X-linked hyper-IgM syndrome reveals a regulatory role for CD40 ligand in osteoclastogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:5056-5061.
118. Titanji K, Vunnava A, Sheth AN, Delille C, Lennox JL, Sanford SE, Foster A, Knezevic A, Easley KA, Weitzmann MN, Ofotokun I: **Dysregulated B cell expression of RANKL and OPG correlates with loss of bone mineral density in HIV infection.** *PLoS Pathog* 2014, **10**:e1004497.
119. Gazzola L, Bellistri GM, Tincati C, Ierardi V, Savoldi A, Del Sole A, Tagliabue L, d'Arminio Monforte A, Marchetti G: **Association between peripheral T-Lymphocyte activation and impaired bone mineral density in HIV-infected patients.** *J Transl Med* 2013, **11**:51.
120. Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, Starr R, Nicholson SE, Metcalf D, Nicola NA: **Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:114-119.
121. Croker BA, Kiu H, Nicholson SE: **SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway.** *Semin Cell Dev Biol* 2008, **19**:414-422.
122. Liongue C, O'Sullivan LA, Trengove MC, Ward AC: **Evolution of JAK-STAT pathway components: mechanisms and role in immune system development.** *PLoS One* 2012, **7**:e32777.
123. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN, Yoshimura A: **The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop.** *EMBO J* 1999, **18**:1309-1320.
124. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, et al: **A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases.** *Nature* 1997, **387**:921-924.
125. Starr R, Metcalf D, Elefanty AG, Brysha M, Willson TA, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS: **Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking**

- suppressor of cytokine signaling-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:14395-14399.
126. Naka T, Matsumoto T, Narazaki M, Fujimoto M, Morita Y, Ohsawa Y, Saito H, Nagasawa T, Uchiyama Y, Kishimoto T: **Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:15577-15582.
127. Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, Corbin JE, Cornish AL, Darwiche R, Owczarek CM, et al: **SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine.** *Cell* 1999, **98**:597-608.
128. Chen CY, Tsay W, Tang JL, Shen HL, Lin SW, Huang SY, Yao M, Chen YC, Shen MC, Wang CH, Tien HF: **SOCS1 methylation in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia.** *Genes Chromosomes Cancer* 2003, **37**:300-305.
129. Nagai H, Kim YS, Konishi N, Baba M, Kubota T, Yoshimura A, Emi M: **Combined hypermethylation and chromosome loss associated with inactivation of SSI-1/SOCS-1/JAB gene in human hepatocellular carcinomas.** *Cancer Lett* 2002, **186**:59-65.
130. Liu TC, Lin SF, Chang JG, Yang MY, Hung SY, Chang CS: **Epigenetic alteration of the SOCS1 gene in chronic myeloid leukaemia.** *Br J Haematol* 2003, **123**:654-661.
131. Ohishi M, Matsumura Y, Aki D, Mashima R, Taniguchi K, Kobayashi T, Kukita T, Iwamoto Y, Yoshimura A: **Suppressors of cytokine signaling-1 and -3 regulate osteoclastogenesis in the presence of inflammatory cytokines.** *J Immunol* 2005, **174**:3024-3031.
132. Lafferty MK, Fantry L, Bryant J, Jones O, Hammoud D, Weitzmann MN, Lewis GK, Garzino-Demo A, Reid W: **Elevated suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1): a mechanism for dysregulated osteoclastogenesis in HIV transgenic rats.** *Pathog Dis* 2014, **71**:81-89.
133. Yadav A, Fitzgerald P, Sajadi MM, Gilliam B, Lafferty MK, Redfield R, Reid W: **Increased expression of suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1): A**

- mechanism for dysregulated T helper-1 responses in HIV-1 disease. *Virology* 2009, **385**:126-133.**
134. Weitzmann MN, Pacifici R: **T cells: unexpected players in the bone loss induced by estrogen deficiency and in basal bone homeostasis.** *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1116**:360-375.
135. Tebas P, Powderly WG, Claxton S, Marin D, Tantisiriwat W, Teitelbaum SL, Yarasheski KE: **Accelerated bone mineral loss in HIV-infected patients receiving potent antiretroviral therapy.** *AIDS* 2000, **14**:F63-67.
136. McGinty T, Mirmonsef P, Mallon PW, Landay AL: **Does systemic inflammation and immune activation contribute to fracture risk in HIV?** *Curr Opin HIV AIDS* 2016, **11**:253-260.
137. Cafiero C, Gigante M, Brunetti G, Simone S, Chaoul N, Oranger A, Ranieri E, Colucci S, Pertosa GB, Grano M, Gesualdo L: **Inflammation induces osteoclast differentiation from peripheral mononuclear cells in chronic kidney disease patients: crosstalk between the immune and bone systems.** *Nephrol Dial Transplant* 2017.
138. Roodman GD, Windle JJ: **Paget disease of bone.** *J Clin Invest* 2005, **115**:200-208.
139. Koek WNH, van der Eerden BCJ, Alves RDAM, van Driel M, Schreuders-Koedam M, Zillikens MC, van Leeuwen JPTM: **Osteoclastogenic capacity of peripheral blood mononuclear cells is not different between women with and without osteoporosis.** *Bone* 2017, **95**:108-114.
140. Aziz N, Butch AW, Quint JJ, Detels R: **Association of Blood Biomarkers of Bone Turnover in HIV-1 Infected Individuals Receiving Anti-Retroviral Therapy (ART).** *J AIDS Clin Res* 2014, **5**.
141. Nakanishi M, Yoh K, Uchida K, Maruo S, Rai SK, Matsuoka A: **Clinical usefulness of serum tartrate-resistant fluoride-sensitive acid phosphatase activity in evaluating bone turnover.** *J Bone Miner Metab* 1999, **17**:125-130.
142. Scarnecchia L, Minisola S, Pacitti MT, Carnevale V, Romagnoli E, Rosso R, Mazzuoli GF: **Clinical usefulness of serum tartrate-resistant acid phosphatase activity determination to evaluate bone turnover.** *Scand J Clin Lab Invest* 1991, **51**:517-524.

143. Christensen J, Shastri VP: **Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by cathepsin K.** *BMC Res Notes* 2015, **8**:322.
144. Gohda J, Ma Y, Huang Y, Zhang Y, Gu L, Han Y, Li T, Gao B, Gao GF, Inoue J, et al: **HIV-1 replicates in human osteoclasts and enhances their differentiation in vitro.** *Retrovirology* 2015, **12**:12.

