

Alterazioni del metabolismo osseo nei bambini HIV-infetti

Changes in bone metabolism in HIV-infected children

A. Maccabruni

R. Mora¹

C. Lazzaroni

L. Pedrotti¹

RIASSUNTO

Nei bambini HIV-infetti sono descritti quadri di ridotta densità ossea, nella cui patogenesi interferirebbero la malattia di base e i farmaci antiretrovirali. L'indagine si propone di valutare, accanto al rischio di incidenza di queste forme e alla possibile correlazione con le terapie, la sensibilità della densitometria a ultrasuoni per una diagnosi precoce.

Abbiamo condotto uno studio quinquennale su 17 bambini HIV-infetti, asintomatici, in terapia HAART, con indagini biochimiche (concentrazione sierica di Ca e P, fosfatasi alcalina, osteocalcina, concentrazione urinaria di CTX, conteggio linfociti CD4+, valutazione dei livelli di viremia HIV) e indagini strumentali (densitometria ultrasonografica).

È stata evidenziata osteopenia/osteoporosi nel 58% dei casi, per la maggior parte in trattamento con IPs. I livelli di osteocalcina mostravano un incremento fino a valori superiori alla norma nei pazienti trattati con IPs da almeno 18-24 mesi, risultando nella norma al di sotto di questo limite temporale. Nel 60% dei casi il rischio di osteopenia/osteoporosi era correlabile con la progressione dell'immunodeficienza.

La densitometria a ultrasuoni si è dimostrata altamente sensibile, individuando precocemente quadri di ridotta resistenza ossea, e appare raccomandabile per il monitoraggio di questi pazienti, nei quali una diagnosi tempestiva può consentire l'adozione di misure profilattiche e terapeutiche più efficaci.

Parole chiave: infezione da HIV, terapia antiretrovirale, resistenza ossea

SUMMARY

In HIV-infected children, patterns of lower bone density are reported, where both illness and antiretroviral drugs seem to interfere. Aim of this study is to evaluate the risk of incidence of these conditions, the possible correlation with the therapy, the sensitivity of ultrasonographic densitometry for an early diagnosis.

A five-year study on 17 HIV-infected, asymptomatic, HAART-treated children was performed. Serum levels of calcium, phosphate, alkaline phosphatase, osteocalcin, urinary CTX concentrations, CD4+ lymphocytes, HIV viral load were evaluated, and ultrasonographic bone densitometry was performed.

Osteoporosis/osteopenia was detected in 58% of cases, mostly of which treated with IPs. The osteocalcin serum levels were incremented up to range of normality in patients that have been treated for at least 18-24 months, and were normal in patients treated for less than 18 months. In 60% of cases the risk for osteoporosis/osteopenia could be correlated with immunodeficiency progression.

Clinica delle Malattie Infettive
c/o Policlinico "San Matteo",
Pavia

¹ Clinica Ortopedica e
Traumatologica c/o Polo
Universitario "Città di Pavia",
Pavia

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof. R. Mora

via Vidari 1

27100 Pavia, Italia

Tel. +39 0382 302367

E-mail: tinomora@hotmail.com

Ricevuto il 12 settembre 2006

Accettato il 26 settembre 2006

Ultrasonographic densitometry proved to be highly sensitive, by precociously detecting patterns of lower bone strength, and is reliable in monitoring these patterns, when an early diagnosis can allow to take more effective prophylactic and therapeutic measures.

Key words: HIV infection, antiretroviral therapy, bone strength

INTRODUZIONE

A partire dal 1990, anno a cui risale la prima segnalazione relativa alla suscettibilità delle cellule osteoblastiche e osteoclastiche all'infezione da HIV¹, sono stati descritti con sempre maggiore frequenza quadri di gravità variabile dall'osteopenia di grado moderato fino all'osteonecrosi in pazienti adulti (per i quali risulta particolarmente elevato il rischio di fratture patologiche^{2,3}) e, in epoca più recente, anche in bambini e adolescenti⁴⁻⁸.

L'estrema variabilità degli aspetti morfologici riscontrati a livello osseo nel corso dell'infezione da HIV induce a ritenere che nella genesi delle diverse forme intervengano, secondo meccanismi e tempi solo in parte chiariti, più fattori, riconducibili non solo alla progressione della patologia di base e alla possibile interferenza di fattori ormonali, comportamentali e/o nutrizionali direttamente correlati allo stato di infezione, ma anche agli effetti dismetabolici dei farmaci antiretrovirali, nell'ambito dei quali gli Inibitori delle Proteasi (IPs) sembrano rivestire un ruolo causale preponderante^{5-9,12}.

I risultati di studi sperimentali dimostrano infatti che alcuni dei farmaci appartenenti a questa classe (in particolare Nelfinavir, Indinavir, Lopinavir e Ritonavir) sarebbero in grado di inibire funzionalmente gli osteoblasti e di attivare gli osteoclasti, favorendo il riassorbimento osseo¹⁰; secondo altri Autori gli IPs agirebbero invece rallentando i processi enzimatici di bioattivazione della vitamina D a 1,25deidrossi-vitamina D (calcitriolo) e riducendo la deposizione del calcio a livello scheletrico¹³.

L'aderenza ai protocolli di terapia HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*), quindi, pur coincidendo con un decisivo miglioramento delle aspettative di sopravvivenza e della qualità della vita dei pazienti HIV-infetti, li espone ad effetti tossici che divengono in genere più frequenti e severi quanto più prolungato è il trattamento e che possono evidenziarsi entro diversi ambiti metabolici; per quanto riguarda lo scheletro tali effetti possono com-

promettere gravemente lo sviluppo della massa ossea a partire dall'infanzia o dalla preadolescenza, favorendo l'instaurarsi di deformità irreversibili e aumentando il rischio di fratture anche per traumi di lieve entità.

Le implicazioni dello stato di infezione e delle terapie antiretrovirali sull'accrescimento e sull'organizzazione strutturale dell'osso appaiono particolarmente rilevanti nei soggetti di sesso femminile, poiché è dimostrato che il 37% della massa ossea viene raggiunto nelle ragazze nel periodo di tempo che intercorre fra lo stadio 2 e lo stadio 5 dello sviluppo puberale¹⁴.

La disponibilità di uno o più strumenti che consentano di individuare con sicurezza alterazioni della resistenza ossea, prima che queste si traducano in eventi clinicamente rilevanti e che risultino di impiego sicuro anche nel paziente pediatrico, appare di estrema importanza nell'ambito dell'iter diagnostico rivolto ai diversi aspetti della patologia da HIV e agli effetti indesiderati della terapia antiretrovirale, poiché una diagnosi tempestiva può consentire l'attuazione di misure profilattiche e terapeutiche di maggiore efficacia. La resistenza ossea deve essere modernamente intesa come caratteristica fondamentale dell'osso, cui contribuiscono fattori quantitativi (densità ossea) e qualitativi (proprietà strutturali, proprietà biomeccaniche, turnover osseo)¹⁵.

Ci siamo pertanto proposti di determinare, nell'ambito di una popolazione costituita da bambini e adolescenti HIV-infetti per via verticale e clinicamente asintomatici seguiti nell'arco di un quinquennio, l'incidenza di quadri di alterata resistenza ossea basandoci sulla valutazione di parametri biochimici e sull'impiego periodico della tecnica densitometrica ad ultrasuoni (che rappresenta una metodica innovativa per le caratteristiche di sicurezza e di non invasività e per la capacità di esprimere caratteristiche fisico-strutturali del tessuto osseo in aggiunta alle informazioni di tipo quantitativo)^{16,17} e valutando il possibile ruolo causale della terapia antiretrovirale.

PAZIENTI E METODI

Nel periodo gennaio 2001-dicembre 2005 abbiamo sottoposto a periodici controlli ematochimici e strumentali, principalmente finalizzati alla valutazione del metabolismo osseo, una popolazione costituita da 17 bambini e adolescenti (9 maschi e 8 femmine) HIV-infetti per via verticale, di età media pari a 11 anni (min 3, max 14 anni) all'inizio dello studio, tutti in terapia con associazione di

farmaci antiretrovirali, seguiti presso gli Ambulatori del Dipartimento di Malattie Infettive in collaborazione con la Clinica Ortopedica e Traumatologica – Polo Universitario “Città di Pavia” – dell’Università di Pavia. Per tutta la durata dello studio nessuno dei pazienti ha manifestato segni o sintomi di progressione della patologia di base, che si è mantenuta in fase asintomatica o paucisintomatica (Categoria A)¹⁸.

In base alla terapia antiretrovirale effettuata, i pazienti studiati (per alcuni dei quali si è reso necessario modificare nel corso dello studio il regime terapeutico di partenza) possono essere suddivisi in tre gruppi.

Un primo gruppo comprendeva 5 casi trattati per l’intera durata dello studio secondo protocolli terapeutici che includevano farmaci IPs.

Un secondo gruppo era costituito da 5 pazienti trattati con farmaci IPs per i primi 18-24 mesi dello studio e successivamente passati a regimi basati sull’impiego di NRTIs +/- NNRTIs.

Per questi gruppi di pazienti la durata del trattamento con IPs al momento in cui lo studio ha avuto inizio risultava pari a 11,3 +/- 7,2 mesi (mediana 9 mesi; range 1-32 mesi).

Il terzo gruppo era costituito da 7 casi trattati secondo protocolli che non includevano farmaci IPs.

Con scadenza trimestrale si è proceduto alla valutazione dei seguenti parametri biochimici relativi al metabolismo del tessuto osseo: concentrazione sierica di calcio, fosfati inorganici, fosfatasi alcalina ossea, osteocalcina (indice di osteosintesi); concentrazione urinaria di CTX (telopeptide C terminale della molecola di collagene tipo 1) quale indice di riassorbimento osseo.

Allo scopo di standardizzare i risultati riducendo l’interferenza della variabilità circadiana i campioni di sangue sono stati prelevati fra le 8 e le 10 del mattino e processati entro 2 ore dal prelievo mentre i campioni di urine sono stati ricavati dalla seconda emissione della giornata e conservati alla temperatura di -30 °C fino all’esecuzione dell’indagine mediante metodica quantitativa immunocromatografica Osteosal (Provalis Ltd, Deeside, UK) che utilizza anticorpi monoclonali altamente affini e specifici per CTX; su tutti i dosaggi della concentrazione urinaria di CTX è stata inoltre eseguita la normalizzazione per la creatinina.

I risultati dell’indagine sono espressi per comodità come T-score, che esprime il numero di deviazioni standard rispetto al valore medio calcolato nell’ambito di una popolazione di controllo, costituita da donne sane in età

pre-menopausale e indicato come T-score = 0. Un valore di T-score positivo o negativo equivale a un livello di turnover osseo più elevato o più basso. È importante sottolineare che, mentre il T-score della densità ossea aumenta con l’aumentare della densità, il T-score di Osteosal diminuisce con la diminuzione del livello di turnover osseo. Con scadenza annuale i pazienti sono stati inoltre sottoposti a densitometria ultrasonografica ossea effettuata con apparecchio Omnisense (Sunlight Technologies, Rehovot, Israel), che misura in modo non invasivo la velocità delle onde ultrasonore – *Speed of Sound* (SOS) in m/sec – che si propagano lungo l’osso. Si tratta di un apparecchio “*multisite*”, che può misurare la velocità di attraversamento dell’osso da parte del suono in più sedi scheletriche. Le misurazioni della velocità di propagazione degli ultrasuoni sono state eseguite in ciascun paziente a livello del terzo medio della tibia e del terzo distale del radio. Il numero medio di indagini densitometriche a cui ciascun paziente è stato sottoposto nel corso dello studio è pari a 3,7.

L’esito dell’indagine densitometrica è stato ritenuto diagnostico nei casi in cui, in occasione di almeno due controlli consecutivi, i risultati ottenuti sono apparsi fra loro sovrapponibili.

Per interpretare criticamente i risultati ultrasonografici dei pazienti inclusi nello studio, essi sono stati confrontati con quelli ottenuti in un gruppo di controllo. La “curva di riferimento” fornita dall’apparecchio Omnisense è una curva pediatrica “generale”, ricavata da una popolazione campione di origine caucasica di età compresa fra 0 e 21 anni. Poiché fattori ambientali possono influenzare i valori di densità ossea e il raggiungimento del picco di massa ossea nell’infanzia e nell’adolescenza, sono state preliminarmente da noi costruite le curve di riferimento pediatriche per la popolazione italiana, sulla base delle quali poter eseguire le valutazioni, escludendo quindi l’eventuale influenza di fattori ambientali. Le curve sono state costruite in base al rilevamento dei valori di SOS al radio e alla tibia in 600 soggetti di età infantile e adolescenziale dell’area di Pavia^{19 20}.

In accordo con i criteri stabiliti dal WHO per la diagnosi di osteoporosi i pazienti con T-score compreso fra +1 e -1 SD (Deviazione Standard) rispetto al valore medio calcolato per soggetti di età corrispondente sono stati considerati normali; la diagnosi di osteopenia è stata formulata per valori di T-score compresi fra -1 e -2,5 SD, mentre valori inferiori a -2,5 SD sono stati interpretati come indici di osteoporosi.

I dati biochimici e strumentali relativi al metabolismo scheletrico sono stati interpretati in base alla possibile interferenza dei farmaci antiretrovirali impiegati e alle variazioni degli indici di evoluzione dell'infezione da HIV (linfociti CD4+ e livelli di viremia).

RISULTATI

La periodica esecuzione di indagini densitometriche a livello scheletrico con l'impiego di apparecchiatura ad ultrasuoni ha consentito di evidenziare, in rapporto alle curve di riferimento, quadri di osteopenia/osteoporosi nel 58% dei casi considerati (10/17), in prevalenza di sesso femminile (Figg. 1, 2).

La più elevata incidenza di quadri di ridotta densità si è riscontrata nell'ambito del gruppo di pazienti che, nel corso dello studio, sono stati trattati secondo protocolli HAART che includevano farmaci IPs (Nelfinavir, Lopinavir, Ritonavir), senza alcuna relazione con la durata del trattamento (7/10 casi). Per contro, solo uno dei pazienti che non sono mai stati trattati con IPs è risultato affetto da osteopenia in occasione di una singola valutazione densitometrica.

Per quanto riguarda l'osteocalcina, facendo riferimento alla casistica nel suo complesso la concentrazione mediana nel siero è risultata più elevata nei pazienti in trattamento con IPs rispetto a quelli che non sono mai stati trattati con questi farmaci; nell'ambito del gruppo di pazienti trattati fin dall'inizio dello studio con IPs si è osservato un incremento dei livelli sierici di osteocalcina fino a valori superiori alla norma solo dopo i primi 18-24 mesi di trattamento, mentre al di sotto di questo limite temporale si sono registrate concentrazioni normali (comprese cioè fra 3,2 e 12,2 ng/ml per i maschi e fra 2,7 e 11,7 ng/ml per le femmine) o di poco superiori alla norma.

La concentrazione urinaria di CTX è risultata nettamente superiore alla norma (T-score rispettivamente 1,8 e 3,1) nei soli due casi in cui era stata posta diagnosi di osteoporosi, mentre in concomitanza con quadri di osteopenia tale parametro è risultato pressoché normale ad ogni misurazione, così come nei soggetti nei quali le indagini ultrasonografiche non avevano evidenziato alcuna alterazione della densità ossea.

Le concentrazioni di calcio e fosfati nel siero sono risultate costantemente nella norma sia in questi casi che nei soggetti nei quali non si sono rilevate alterazioni della densità ossea.

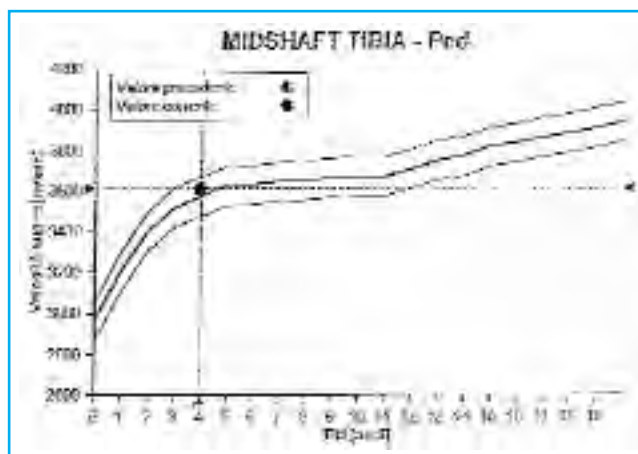


Fig. 1. A.A., anni 4, sesso F. Densitometria ossea a ultrasuoni: quadro di normalità.

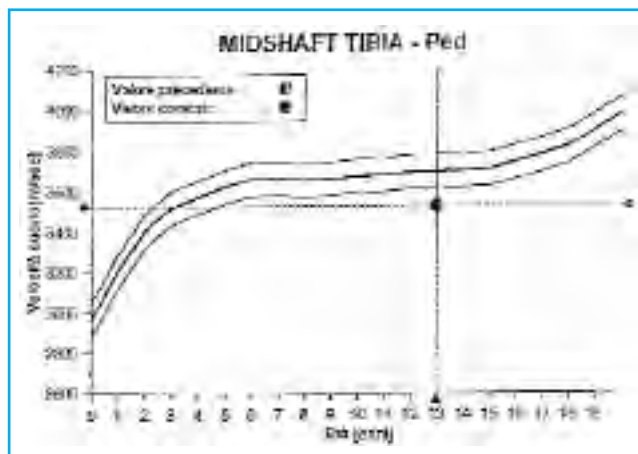


Fig. 2. A.M., anni 13, sesso M. Densitometria ossea a ultrasuoni: quadro di ridotta massa ossea.

Immunocompromissione di grado moderato (linfociti CD4+ 200-500/mm³) o di grado avanzato (< 200/mm³) si è manifestata in 6/10 pazienti affetti da osteopenia/osteoporosi (pari al 60% dei casi con ridotta densità ossea); in uno solo di questi, tuttavia, i livelli di viremia si sono costantemente mantenuti su valori > 10.000 copie/ml mentre negli altri sono risultati < 50 copie/ml (1 caso) o compresi fra 50 e 10.000 copie/ml (4 casi).

In tutti i pazienti con densità ossea nella norma i linfociti CD4+ sono risultati ad ogni controllo > 200/mm³ (superando stabilmente la quota di 500/mm³ nel 60% dei casi) e la viremia non ha mai superato il valore di 10.000 copie/ml.

Benché l'esiguità numerica della casistica non abbia con-

sentito di effettuare un'analisi statistica è stato tuttavia possibile identificare nell'ambito dei casi considerati una sicura tendenza verso un maggiore rischio di insorgenza di quadri di osteopenia/osteoporosi in concomitanza con quote di $CD4+ \leq 200/mm^3$.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le motivazioni che ci hanno indotto ad impiegare la densitometria ad ultrasuoni per la valutazione a lungo termine delle variazioni della resistenza ossea nella popolazione in oggetto si sono basate inizialmente, come già accennato, sulle caratteristiche di sicurezza e di non-invasività della procedura, che ne rendono consigliabile l'impiego anche in pazienti con particolari esigenze (neonati e lattanti, donne in gravidanza) nonché in tutti i casi che richiedono una o più ripetizioni dell'indagine entro brevi intervalli di tempo.

La scelta della metodica, inoltre, è stata in parte influenzata dalle piccole dimensioni dell'apparecchio, che ne facilitano il trasporto, rendendo agevole l'esecuzione dell'indagine anche al letto del paziente senza alcun rischio per le persone eventualmente presenti nello stesso ambiente.

La scelta si è basata anche sulla possibilità di ottenere accurate informazioni su tutti i fattori che influiscono sulla resistenza ossea (competenza biomeccanica ed elementi legati alla qualità dell'osso).

Nel corso dello studio la densitometria ad ultrasuoni si è altresì rivelata quale presidio diagnostico altamente sensibile, consentendo di individuare un'elevata incidenza di casi di osteopenia/osteoporosi in bambini e adolescenti HIV-infetti altrimenti sani.

I risultati dell'indagine densitometrica, inoltre, evidenziando con maggiore frequenza quadri di riduzione della densità ossea in pazienti trattati con IP e fin dai primi 18-24 mesi di terapia, hanno confermato il ruolo significativo dei farmaci antiretrovirali appartenenti a questa classe nella genesi delle alterazioni ossee a partire dai primi anni di vita.

Per quanto riguarda il dosaggio dell'osteocalcina, scelta all'inizio dello studio quale indice di osteosintesi, i dati relativi ai casi seguiti non hanno permesso di chiarirne completamente il significato diagnostico.

Il riscontro di concentrazioni sieriche più elevate nei casi trattati da almeno 2 anni con IP sembrerebbe confermare i risultati ottenuti mediante l'indagine densitometrica,

indicando cioè più vivaci processi di mineralizzazione ossea in soggetti trattati con farmaci in grado di indurre quadri più o meno avanzati di osteoporosi; in questi pazienti, tuttavia, la persistenza di elevati livelli di osteocalcina nel siero potrebbe derivare da un'inibizione delle proteasi deputate alla sua degradazione causata dai farmaci antiretrovirali stessi, il cui bersaglio non è specificamente rappresentato da proteine virali²¹.

Studi sperimentali istomorfometrici condotti "in vivo" nei roditori hanno d'altra parte dimostrato che l'osteocalcina in elevate concentrazioni può agire come inibitore anziché come attivatore dei processi di osteosintesi, causando indirettamente anche un rallentamento dei meccanismi di riassorbimento osseo²²: si spiegherebbero così anche le scarse variazioni dei livelli urinari di CTX riscontrate nei casi in esame.

Infine, i dati relativi alla casistica indicano l'esistenza di una sicura correlazione fra il grado di immunocompromissione HIV-indotta e il rischio di insorgenza di quadri di ridotta resistenza ossea, che si instaurerebbero quindi nell'ambito della progressione dello stato di infezione, come già sostenuto da numerosi Autori in era pre-HAART^{23 24}.

I risultati ottenuti, pur non consentendo di giungere a conclusioni definitive circa l'origine dei quadri di ridotta mineralizzazione ossea in corso di infezione-malattia da HIV, ne sottolineano la non trascurabile incidenza, destinata ad aumentare grazie alle sempre migliori prospettive di vita legate a terapie antiretrovirali più efficaci e rese sempre più accettabili per i pazienti.

Il problema assume connotazioni particolarmente gravi nei bambini e negli adolescenti, nei quali le conseguenze di una cronica riduzione della massa ossea potrebbero risultare irreversibilmente invalidanti. È opportuno quindi predisporre protocolli accurati per il monitoraggio dello sviluppo scheletrico di questi pazienti, basato sull'impiego di indagini strumentali – fra le quali trova specifica indicazione la densitometria ad ultrasuoni – e biochimiche, previa individuazione degli indici metabolici più sensibili; ognuno di essi dovrebbe inoltre essere seguito con un programma adeguato all'età e alle caratteristiche individuali, che includa, accanto ad una regolare attività fisica mirata al potenziamento della muscolatura scheletrica, il controllo della dieta, con particolare riferimento all'apporto quotidiano di calcio e vitamina D.

Sarebbe, infine, necessario provvedere alla stesura di linee-guida per l'approccio terapeutico ai quadri di ridotta resistenza ossea in bambini e adolescenti HIV-infetti

trattati o meno con farmaci antiretrovirali, benché i dati relativi all'efficacia di presidi ormonali (estrogeni), di modulatori selettivi di recettori ormonali o dei difosfonati nel migliorare il processo di mineralizzazione dell'osso siano tuttora incompleti e non univoci²⁵.

Solo ricerche condotte nell'ambito di casistiche più numerose e seguite con programmi di follow-up di più lunga durata potranno consentire di rispondere con sicurezza ai molti interrogativi tuttora aperti circa i meccanismi patogenetici alla base di queste alterazioni metaboliche, la reale incidenza di fratture patologiche e deformità nei pazienti pediatrici affetti da osteopenia/osteoporosi e le più idonee strategie diagnostiche e terapeutiche proponibili.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Mellert W, Kleinschmidt A, Schmidt J, Festl H, Emler S, Roth WK, et al. *Infection of human fibroblasts and osteoblast-like cells with HIV-1*. AIDS 1990;4:527-35.
- 2 Guaraldi G, Ventura P, Albuzza M, Orlando G, Bedini A, Amorico G, et al. *Pathological fractures in AIDS patients with osteopenia and osteoporosis induced by antiretroviral therapy*. AIDS 2001;15:137-8.
- 3 Miller KD, Masur H, Jones EC, Joe GO, Rick ME, Kelly GG, et al. *High prevalence of osteonecrosis of the femoral head in HIV-infected adults*. Ann Intern Med 2002;137:17-25.
- 4 Monier P, McKown K, Bronze MS. *Osteonecrosis complicating highly active antiretroviral therapy in patients infected with human immunodeficiency virus*. Clin Infect Dis 2000;31:1488-92.
- 5 Knobel H, Guelar A, Vallecillo G, Noguès X, Diez A. *Osteopenia in HIV-infected patients: is it the disease or is it the treatment?* AIDS 2001;15:807-8.
- 6 Miller TL, Mawn BE, Orav EJ, Wilk D, Weinberg GA, Nicchitta J, et al. *The effect of protease inhibitor therapy on growth and body composition in human immunodeficiency virus-1-infected children*. Pediatrics 2001;107:E77-E83.
- 7 Hayes EV, McGann KA. *Complications of human immunodeficiency virus therapy*. Ped Infect Dis J 2004;23:873-4.
- 8 Mora S, Zamproni I, Beccio S. *Longitudinal changes of bone mineral density and metabolism in antiretroviral-treated human immunodeficiency virus-infected children*. J Clin Endocrinol Metabol 2005;89:24-8.
- 9 Tan BM, Nelson RP Jr, James-Yarish M, Emmanuel PJ, Schurman SJ. *Bone metabolism in children with human immunodeficiency virus infection receiving highly active antiretroviral therapy including a protease inhibitor*. J Ped 2001;139:447-51.
- 10 Jain RG, Lenhard JM. *Select HIV Protease Inhibitors Alter Bone and Fat metabolism "ex vivo"*. J Biol Chem 2002;277:19247-50.
- 11 Arpadi S, Horlick M, Shane E. *Metabolic bone disease in human immunodeficiency virus-infected children*. Clin Endocrinol Metabol 2004;89:21-3.
- 12 Jacobson DL, Spiegelman D, Duggan C, Weinberg GA, Bechard L, Furuta L, et al. *Predictors of bone mineral density in human immunodeficiency virus-1 infected children*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005;41:339-46.
- 13 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;17:513-20.
- 14 O'Brien KO, Razavi M, Henderson RA, Caballero B, Ellis KJ. *Bone mineral content in girls perinatally infected with HIV 1-3*. Am J Clin Nutr 2001;73:821-6.
- 15 Felsenberg D, Boonen S. *The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management*. Clin Ther 2005;27:1-11.
- 16 Heaney RP, Avioli LV, Chesnut CH, Lappe J, Recker RR, Brandenburger GH. *Osteoporotic bone fragility. Detection by ultrasound transmission velocity*. JAMA 1989;261:2986-90.
- 17 Lusenti T, Cadossi R, Franco V, Soliani F, Rustichelli R, Borgatti PP. *Valutazione del tessuto osseo con ultrasuoni (US) sulla falange prossimale delle mani nelle pazienti con sospetta osteoporosi di tipo I*. Minerva Ginecol 1994;46:423-8.
- 18 Centers for Disease Control and Prevention. *1994 revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. Official authorized addenda: human immunodeficiency virus infection codes and official guidelines for coding and reporting ICD - 9-CM*. MMWR 1994;43 (RR-12).
- 19 Pedrotti L, Mora R, Tuvo G, Miceli M, Livieri C, Quaglini S. *Italian pediatric reference curves for quantitative ultrasound bone measurements at multiple skeletal sites*. Bone 2005;36(Suppl 2):P026.
- 20 Pedrotti L, Bertani B, Tuvo G, Mora R, Quattrini F, Quaglini S. *Valutazione della resistenza dell'osso nella popolazione pediatrica: creazione di una curva di riferimento locale*. Proc. 12° Congr. Naz. S.I.T.O.P. Anacapri, Sett. 2005.
- 21 Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, Kaufmann GR, Chisholm DJ, Cooper DA. *Diagnosis, prediction and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia and diabetes mellitus: a cohort study*. Lancet 1999;353:2093-9.
- 22 Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. *Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice*. Nature 1996;382:448-52.
- 23 Serrano S, Marinoso ML, Soriano JC, Rubies-Prat J, Aubia J, Coll J, et al. *Bone remodeling in human immunodeficiency virus-1-infected patients. A histomorphometric study*. Bone 1995;16:185-91.
- 24 Paton NI, Macallan DC, Griffin GE, Pazianas M. *Bone mineral density in patients with human immunodeficiency virus infection*. Calcif Tissue Int 1997;61:30-3.
- 25 Lawal A, Engelson E, Wang J, Heymsfield S, Kotler D. *Effect of oxandrolone upon bone mineral content in malnourished HIV+ patients*. Proc. 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Alexandria, VA: Foundation for Retrovirology and Human Health, 2001:235.