

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Estudio de la contribución de las células endoteliales progenitoras y las partículas de colesterol HDL en los mecanismos de daño y reparación vascular en pacientes infectados por VIH

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Adriana Ortega Hernández

Directores

Dulcenombre Gómez Garre
Vicente Estrada Pérez
Arturo Fernández-Cruz

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS
ENDOTELIALES PROGENITORAS Y LAS PARTÍCULAS
DE COLESTEROL HDL EN LOS MECANISMOS DE
DAÑO Y REPARACIÓN VASCULAR EN PACIENTES
INFECTADOS POR VIH.**

TESIS DOCTORAL

ADRIANA ORTEGA HERNÁNDEZ.

Hospital Clínico San Carlos

Madrid, 2014.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS
ENDOTELIALES PROGENITORAS Y LAS PARTÍCULAS
DE COLESTEROL HDL EN LOS MECANISMOS DE DAÑO
Y REPARACIÓN VASCULAR EN PACIENTES
INFECTADOS POR VIH.**

TESIS DOCTORAL

Doctorando: Adriana Ortega Hernández

Madrid, 2014

Tesis doctoral dirigida por:

Dra. Dulcenombre Gómez Garre

Dr. Vicente Estrada Pérez

Prof. Arturo Fernández-Cruz

DRA. DULCENOMBRE GÓMEZ GARRE, investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, **DR. VICENTE ESTRADA PÉREZ**, jefe de sección del Servicio de Medicina Interna/Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico San Carlos y el **PROF. ARTURO FERNÁNDEZ-CRUZ**, Catedrático Emérito del Departamento de Medicina de la UCM.

CERTIFICAN:

Que la Tesis titulada ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES PROGENITORAS Y LAS PARTÍCULAS DE COLESTEROL HDL EN LOS MECANISMOS DE DAÑO Y REPARACIÓN VASCULAR EN PACIENTES INFECTADOS POR VIH, presentada por la Lda. ADRIANA ORTEGA HERNÁNDEZ para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo muestra dirección en el Hospital Clínico San Carlos y, considerándola concluida, autorizan su presentación a fin que pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente.



Fdo.: Dra. Dulcenombre Gómez Garre



Fdo.: Dr. Vicente Estrada Pérez



Fdo.: Prof. Arturo Fernández-Cruz

Y por fin llegó el gran día, después de mucho esfuerzo y trabajo he llegado al final de una etapa que espero que sea el comienzo de mi carrera como investigadora. Quién me iba a decir a mí cuando comencé la carrera de Biología que me iba a dedicar a la investigación y que me iba a convertir en “Doctora”. Todos los llantos y sufrimientos de esos primeros años han valido la pena. Por eso solo puedo agradecer a todas esas personas que me apoyaron y aconsejaron que no abandonara mis estudios porque en esta vida las cosas siempre pasan por algo. Y así es, a día de hoy puedo decir con voz alta y clara que me alegro de no haber abandonado y encaminar mi futuro a la investigación, aunque sea un trayecto arduo y complicado.

Sin más preámbulos, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis sin los cuales este trabajo nunca habría salido adelante. Maritina, gracias por haber confiado en mí y darme la oportunidad de trabajar y aprender contigo en el laboratorio. Gracias por guiarme y aconsejarme en estos años, por no desesperarte por mi falta de “vena literaria” a la hora de escribir la tesis, por enseñarme todo lo que sé y sobre todo por ayudarme a llegar hasta aquí. También quiero agradecer al Dr. Vicente Estrada su apoyo durante todos estos años, ya que ha creído firmemente en este proyecto y en mi trabajo. Y al Prof. Fernández-Cruz por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación en el que tantas cosas he aprendido.

A mis padres, por estar siempre ahí, por dejaros la piel para que tuviera la mejor educación, por todos los buenos consejos que me habéis dado, por escuchar una y otra vez las “charlas” que he tenido que defender en estos años, por aguantarme en esos días de bajón en los que las cosas no salían todo lo bien que yo quería y por ayudarme siempre que lo he necesitado. A mi hermana Sara, que también ha tenido que escuchar hasta la saciedad mis presentaciones poniendo cara de que todo era muy interesante aunque la pobre no se estuviera enterando de nada. Gracias por aguantar mis nervios y mis malos humos sobre todo en estos últimos meses más tensos para mí. A mi tía Isabel, por ser como es, por estar pendiente de mis progresos día a día y tenerme siempre en sus oraciones. Sois la mejor familia que se puede tener, por eso os dedico a vosotros esta tesis.

A mis abuelas, que aunque no han podido ver el resultado final de mi trabajo, sé que en donde estén se sienten muy orgullosas de mí.

A mis amigos, que sabéis quienes sois, por animarme y apoyarme en este largo camino, por vuestras palabras de aliento y por estar a mi lado tanto en los buenos como en los malos momentos.

A Paloma, mi “compi” en el laboratorio, por haberme ayudado tanto en la parte científica como en la humana, por haber compartido conmigo tantos buenos momentos y estar siempre dispuesta a echarme una mano cuando lo he necesitado. A Marta, aunque no hayamos compartido muchas horas de laboratorio juntas si que hemos tenido largas conversaciones de todos los temas posibles. Gracias por informarme de todas las novedades que iban surgiendo en relación a los papeleos previos a la lectura de la tesis y por prestarme tu ayuda para cualquier problema que me pudiera surgir. A Ana, aunque tu estancia en el laboratorio fue breve, he pasado muy buenos momentos contigo.

Al Prof. Luís Masana por su inestable ayuda en la realización de parte de este trabajo. A Mercedes Heras, por aislarme las HDL tan preciadas para mí para poder realizar parte de los experimentos de esta tesis.

Al grupo de investigación de la Dra. Vicenta Llorente del ICC, en especial a Laura, por enseñarme todo el proceso de aislamiento de lipoproteínas y por tratarme estupendamente durante mi estancia en Barcelona.

A la red de investigación cardiovascular REDINSCOR, gracias a la cual se ha financiado mi contrato durante los años que he estado realizando mi tesis doctoral.

Me gustaría agradecer a mis compañeras del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá de Henares, donde di mis primeros pasos en la investigación durante el último año de universidad, y al Prof. Juan Carlos Prieto Villapún, por aceptarme en su grupo en mis años de estudiante y siempre estar dispuesto a ayudarme en todo.

Y para terminar solo me queda dar las GRACIAS a todos los participantes de este estudio, tanto los voluntarios control como los pacientes VIH, ya que sin vuestra colaboración habría sido imposible poder realizar este trabajo.

*A mis padres, a mi hermana Sara
y a mi tía Isabel*

ÍNDICE

Clave de abreviaturas.

1. INTRODUCCIÓN

| | |
|---|----|
| 1.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA ATROSCLEROSIS. INFLUENCIA DE LA INFECCIÓN POR VIH | 4 |
| 1.1.1. Inicio del proceso de formación de la placa | 5 |
| 1.1.2. Desarrollo de la placa | 8 |
| 1.1.3. Ruptura de la placa | 10 |
| 1.2. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO | 11 |
| 1.2.1. Papel de la células endoteliales progenitoras (EPCs) | 12 |
| 1.2.1.1. Caracterización de las EPCs | 13 |
| 1.2.1.2. Activación de las EPCs | 15 |
| 1.2.1.3. EPCs y enfermedad cardiovascular | 16 |
| 1.2.2. Transporte reverso de colesterol. Funcionalidad de las HDL | 17 |
| 1.2.2.1. Clasificación de las HDL | 19 |
| 1.2.2.2. Metabolismo de las HDL | 20 |
| 1.2.2.3. Proteínas implicadas en el metabolismo de la HDL | 22 |
| Apolipoproteína A-I | 22 |
| Apolipoproteína A-II | 23 |
| Apolipoproteína A-IV | 23 |
| Apolipoproteína E | 24 |
| Serum amiloide A | 24 |
| Lecitín:colesterol aciltransferasa | 25 |
| Paraoxonasa | 26 |
| Lipoproteína asociada a la fosfolipasa A ₂ | 27 |
| Proteína transferidora de ésteres de colesterol | 27 |
| Proteína transferidora de fosfolípidos | 28 |

| | |
|---|----|
| Lipasas | 28 |
| 1.2.2.4. Otras funciones biológicas de la HDL | 29 |
| Actividad antiinflamatoria | 29 |
| Actividad antioxidante | 30 |
| Actividad citoprotectora | 31 |
| Vasodilatación | 32 |
| Actividad antitrombótica | 32 |
| Actividad antiinfecciosa | 32 |

2. OBJETIVOS

| | |
|----------------|----|
| 2.1. OBJETIVOS | 33 |
|----------------|----|

3. MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|--|----|
| 3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO | 35 |
| 3.2. OBTENCIÓN DE SANGRE | 35 |
| 3.3. MEDIDA VARIABLES BIOQUÍMICAS | 36 |
| 3.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES CIRCULANTES DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES (EPCs) | 36 |
| 3.5. ANÁLISIS DE LAS SUBCLASES DE PARTÍCULAS HDL | 38 |
| 3.6. AISLAMIENTO DE LDL Y HDL | 39 |
| 3.7. ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA DE LA HDL | 40 |
| 3.7.1. Ensayo de quimiotaxis de monocitos | 40 |
| 3.7.2. Cuantificación de las moléculas de adhesión ICAM-1 y CD11b | 42 |
| 3.8. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA HDL | 42 |
| 3.8.1. Cuantificación de los niveles plasmáticos de LDL oxidada (LDLox) | 42 |

| | |
|--|----|
| 3.8.2. Efecto de la HDL en la oxidación de la LDL | 43 |
| 3.9. CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA HDL | 44 |
| 3.10. MEDIDA DEL GROSOR ÍNTIMA-MEDIA CAROTÍDEO | 45 |
| 3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 46 |

4. RESULTADOS

| | |
|---|----|
| 4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON VIH | 47 |
| 4.2. NIVELES DE EPCs EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH | 48 |
| 4.2.1. Asociación entre los niveles de EPCs y el GIM-c | 53 |
| 4.2.2. Asociación entre los niveles de EPCs, el GIM-c y el TAR | 56 |
| 4.3. ESTUDIO DE LAS HDL DE PACIENTES VIH | 57 |
| 4.3.1. Estudio de las distintas subclases de HDL en los pacientes VIH | 57 |
| 4.3.2. Estudio de la funcionalidad de las HDL en los pacientes VIH | 60 |
| 4.3.2.1. Actividad anti-inflamatoria de las HDL | 61 |
| 4.3.2.1.1. Efecto de la HDL sobre la quimiotaxis de monocitos humanos | 61 |
| 4.3.2.1.2. Efecto de las HDL sobre la expresión de moléculas de adhesión | 62 |
| 4.3.2.2. Actividad antioxidante de las HDL | 63 |
| 4.3.2.2.1. Capacidad de las HDL de inhibir la oxidación de la LDL "in vitro" | 63 |
| 4.3.2.2.2. Cuantificación de la LDLox en el plasma | 64 |
| 4.3.2.3. Análisis de la composición de las HDL | 65 |

| | |
|--|----|
| 4.3.2.3.1. Apolipoproteína A-I | 65 |
| 4.3.2.3.2. Lecitin:colesterol acil transferasa | 66 |
| 4.3.2.3.3. Amiloide sérico A | 67 |
| 4.3.2.3.4. Lipoproteína asociada a la fosfolipasa A ₂ | 68 |
| 4.4. ASOCIACIÓN ENTRE LA FUNCIÓN DE LA HDL Y LA PRESENCIA DE ARTERIOSCLEROSIS SUBCLÍNICA | 69 |
| 4.4.4. Asociación entre HDL disfuncional y GIM-c | 72 |
| 4.4.5. Asociación entre HDL disfuncional y EPCs | 73 |

5. DISCUSIÓN

| | |
|---|----|
| 5.1. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EPCs Y LA ARTERIOSCLEROSIS SUBCLÍNICA EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH | 75 |
| 5.2. DISTRIBUCIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LA PARTICULAS DE HDL DE PACIENTES CON VIH | 79 |
| 5.3. RELACIÓN ENTRE LOS NIVESLES DE EPCs Y LA FUNCIONALIDAD DE LA HDL EN PACIENTES CON VIH | 86 |

6. CONCLUSIONES

| | |
|-------------------|----|
| 6.1. CONCLUSIONES | 87 |
|-------------------|----|

7. RESUMEN EN INGLÉS

| | |
|--------------|----|
| 7.1. SUMMARY | 89 |
|--------------|----|

8. BIBLIOGRAFÍA

| | |
|-------------------|-----|
| 8.1. BIBLIOGRAFÍA | 104 |
|-------------------|-----|

9. ANEXO

9.1. ANEXO

128

En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

| | |
|---------------------------------|---|
| ABCA-1 | Transportador ATP-binding cassette |
| Apo A | Apolipoproteína A |
| Apo B | Apolipoproteína B |
| Apo C | Apolipoproteína C |
| Apo E | Apolipoproteína E |
| BHT | Hidroxitolueno butilado |
| CETP | Proteína transportadora de colesterol |
| CMLV | Células del músculo liso vascular |
| CXCL12 | CXC ligando de la quimioquina-12 |
| DTNB | 5,5'-ditiobis del ácido 2-nitrobenzoico |
| ECD | Ficoeritrina-Texas red |
| ECV | Enfermedad cardiovascular |
| EDTA | Ácido etilen-diamino-tetraacético |
| EPCs | Células endoteliales progenitoras |
| FITC | Fluorescein Isotiocianato |
| FRCV | Factores de riesgo cardiovascular |
| GIM-c | Grosor intima-media carotídeo |
| HDL | Lipoproteína de alta densidad |
| HIF-1α | Factor inducible de hipoxia-1 α |

| | |
|--------------------------|--|
| HMG-CoA reductasa | Enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa |
| HTA | Hipertensión arterial |
| IAM | Infarto agudo de miocárdio |
| ICAM-1 | Molécula de adhesión intercelular-1 |
| IDL | Lipoproteína de densidad intermedia |
| IMC | Índice de masa corporal |
| ILs | Interleucinas |
| IPs | Inhibidores de proteasas |
| ITINANs | Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos |
| ITIANs | Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos |
| KBr | Bromuro de potasio |
| LCAT | Enzima lecitín-colesterol aciltransferasa |
| LDL | Lipoproteína de baja densidad |
| LDLr | Receptor LDL |
| LpPLA₂ | Lipoproteína asociada a la fosfolipasa A ₂ |
| LPS | Lipopolisacárido |
| MCP-1 | Proteína quimioattractante de monocitos-1 |
| MDA | Malondialdehido |
| MHz | Megahercios |
| MMPs | Metaloproteasas |

| | |
|----------------|---|
| PAD | Presión arterial diastólica |
| PAF | Factor activador de plaquetas |
| PAF-AH | Acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas |
| PAS | Presión arterial sistólica |
| PBS | Suero salino fosfato |
| PC7 | Ficoeritrina-Cianina 7 |
| PE | Ficoeritrina |
| PECAM-1 | Molécula de adhesión plaquetaria a células endoteliales-1 |
| PLTP | Proteína transferidora de fosfolípidos |
| PON-1 | Paraoxonasa-1 |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| SAA | Serum amiloide A |
| SDF-1 | Factor derivado de las células del estroma-1 |
| SMPCs | Células progenitoras circulantes del músculo liso |
| SR-B1 | Receptor scavenger (basura) clase B1 |
| S1P | Esfingofosfolípido-1 |
| TAR | Tratamiento antirretroviral |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| TG | Triglicéridos |

| | |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral- α |
| VCAM-1 | Molécula de adhesión vascular-1 |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial |
| VEGFR-2 | Receptor tirosín quinasa del VEGF |
| VIH | Virus de la inmunodeficiencia humano |
| VLDL | Lipoproteína de muy baja densidad |
| vWF | Factor Von Willibrand |

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los últimos años se ha puesto de manifiesto de manera inequívoca que el tratamiento antirretroviral (TAR) reduce las complicaciones relacionadas con la infección por VIH y el número de casos de sida (figura 1). Sin embargo, este efecto beneficioso ha quedado oscurecido, en parte, por el incremento descrito de otras complicaciones como la enfermedad cardiovascular (ECV), la osteopenia, la lipodistrofia, la resistencia a la insulina o la hiperlactatemia, entre otras [1].

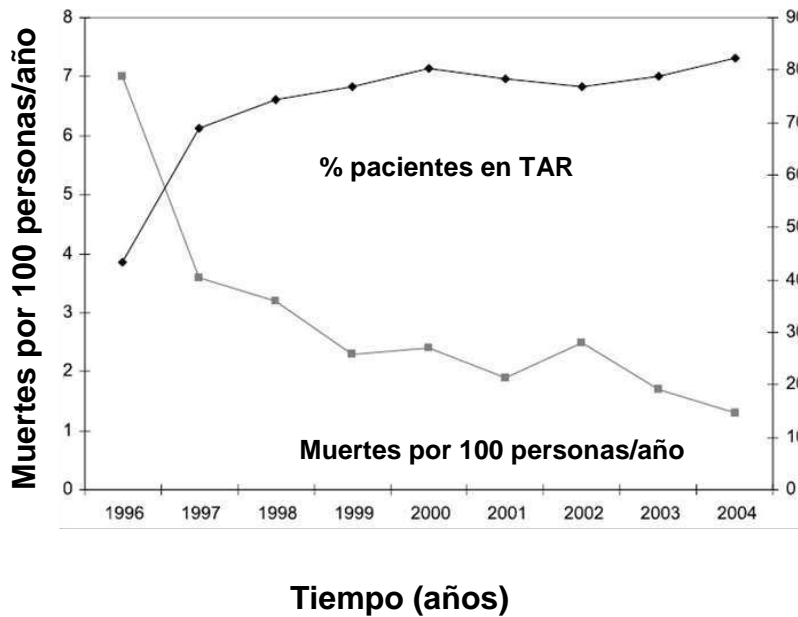


Figura 1. Mortalidad general en personas con infección por VIH y uso del tratamiento antirretroviral (TAR) a lo largo del tiempo (1996-2004) [1].

Los pacientes con VIH tienen un mayor riesgo de padecer complicaciones cardiovasculares, y la arteriosclerosis parece ser la causa principal. Numerosos estudios realizados en distintas cohortes de pacientes con VIH han demostrado que el riesgo de sufrir un infarto agudo de miocardio (IAM) es entre 1,5 y 2 veces superior en estos pacientes que en los sujetos sin infección [2]. Además este mayor riesgo de padecer IAM se mantiene en todos los rangos de edad estudiados, lo que demuestra que no se debe únicamente al aumento en la supervivencia de estos pacientes (figura 2).

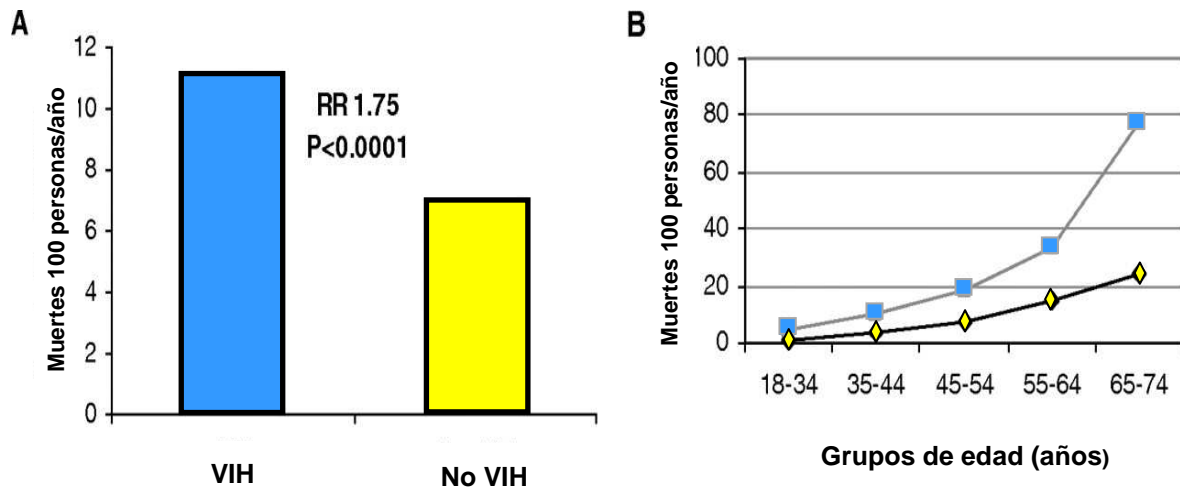


Figura 2. Mortalidad por infarto agudo de miocardio (IAM) en los pacientes con VIH en comparación con la población general sin infección VIH (A). Comparación en la incidencia de IAM en pacientes con (■) y sin (◆) VIH en función del rango de edad (B) [2].

La relación entre la infección por VIH y el desarrollo de la arteriosclerosis ha sido confirmada mediante estudios del grosor de la íntima-media de la carótida (GIM-c). El GIM-c se correlaciona directamente con la presencia de arteriosclerosis coronaria y mayor riesgo de IAM, por lo que es uno de los parámetros más usados para evaluar los efectos en el tiempo de los factores de riesgo cardiovascular (FRCV). En este sentido, numerosos estudios han demostrado que el GIM-c puede ser hasta un 24% mayor en los pacientes con VIH que en los controles emparejados por edad y sexo, y que progresa mucho más rápidamente [3].

Las razones del incremento de ECV son múltiples, y se atribuyen tanto a la propia infección del virus VIH como al TAR, sumados a la mayor prevalencia de los principales FRCV tradicionales, sobre todo el tabaquismo o la dislipemia [4]. La infección por VIH provoca un estado proinflamatorio crónico como resultado de una profunda alteración de la regulación de las citoquinas proinflamatorias, las cuales inducen una importante disfunción endotelial que puede iniciar el desarrollo del proceso arteriosclerótico. Pese a mantener el virus suprimido, gracias al TAR, se observa una persistente actividad inflamatoria puesta de manifiesto, por ejemplo, por elevación de algunas citoquinas como la interleucina 6 (IL-6). Por otra parte, el propio virus tiene un efecto negativo sobre en el perfil lipídico, induciendo un descenso en los niveles de colesterol total, de colesterol LDL

y de colesterol HDL, y un aumento de triglicéridos (TG). Estas variaciones en los lípidos plasmáticos se observan de manera característica en fases avanzadas de la enfermedad y se han relacionado con un estado de actividad inflamatoria dependiente del VIH mediado, al menos en parte por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) [5]. Este patrón lipídico cambia habitualmente tras el inicio del tratamiento, si bien en una importante proporción de pacientes persisten los niveles bajos de HDL (<40 mg/dL). Este nivel bajo de HDL representa por sí mismo un FRCV y, en general, es de difícil manejo terapéutico, ya que no existe ninguna estrategia farmacológica verdaderamente eficaz capaz de incrementar los niveles de HDL [5]

La relación entre el uso del TAR y el riesgo cardiovascular es compleja. Un estudio retrospectivo realizado en Veteranos de Guerra con VIH en tratamiento (*Veterans Affairs Quality Enhancement Database for HIV*) no demostró ningún incremento de los eventos cardiovasculares o cerebrovasculares de estos pacientes en comparación con la población general [6]. Sin embargo, la duración media del TAR fue de 15 meses, una exposición breve para el desarrollo de ECV. Por el contrario, el estudio D:A:D (*Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs*), el primer gran estudio de analizó de forma prospectiva la incidencia de IAM en 23.437 pacientes con VIH durante una media de 4,5 años, demostró un mayor riesgo de IAM cuanto mayor era el número de años en tratamiento [7]. Aunque estos estudios sugieren que la duración del TAR se asocia con un incremento del riesgo de presentar eventos cardiovasculares, el estudio SMART (*Strategies for Management of Antiretroviral Therapy*), realizado con 5.472 pacientes con VIH con uso continuado o intermitente del TAR, demostró que los pacientes que habían interrumpido su tratamiento presentaban una mayor incidencia de ECV con respecto a aquellos que no lo habían hecho [8].

En este momento, se disponen de 5 grupos de fármacos antirretrovirales distintos clasificados según su mecanismo de actuación: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIANs), inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINANs), inhibidores de proteasas (IPs), inhibidores de la integrasa viral e inhibidores de la entrada del virus (Ejemplo: antagonistas de CCR5). A día de hoy, los fármacos más usados pertenecen principalmente al grupo de los ITIAN, ITINAN e IPs [9]. Diversos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que el riesgo cardiovascular no es el mismo en función del tipo de fármaco recibido. Por ejemplo, el estudio DAD demostró que los pacientes con IPs mostraban un aumento del riesgo de IAM del 16% por año en comparación con el 5% por año entre los pacientes con ITINANs. Este riesgo

se redujo al 10% para los IPs y se eliminó para los ITINANs tras ajustar por los lípidos [9]. Por otra parte, es posible que desde el punto de vista del riesgo cardiovascular, no todos los ITINANs sean iguales. Un subanálisis del estudio 2NN, en el que se compara el tratamiento con efavirenz vs nevirapina en pacientes naive, pone de manifiesto que nevirapina posee un mejor perfil lipídico, caracterizado por una menor proporción de pacientes que presentaron elevación de colesterol total y TG, y con niveles superiores de HDL [10,11]. De hecho, se ha demostrado que el cambio de efavirenz por nevirapina en pacientes con hiperlipemia reduce de manera significativa los niveles de LDL [12].

En resumen, aunque numerosas evidencias sugieren una relación entre el TAR y el riesgo de ECV, la mayoría de los estudios coinciden en que el riesgo absoluto de desarrollar IAM en pacientes que reciben TAR es muy bajo con relación al alto beneficio obtenido por la TAR. Pese a ello, el aumento de la incidencia de la ECV en una población joven se convierte en un importante problema de salud pública. Por esto es necesario el desarrollo de marcadores que nos permitan detectar de forma temprana el riesgo cardiovascular de estos pacientes.

1.1. Fisiopatología de la arteriosclerosis. Influencia de la infección por VIH.

La arteriosclerosis es una de las principales causas de ECV. Se trata de una enfermedad lenta y progresiva, de origen multifactorial, que afecta fundamentalmente a las arterias de mediano y mayor calibre y que se caracteriza por el endurecimiento y la pérdida de la elasticidad de la pared vascular. Su lesión básica es la placa de ateroma, compuesta de un núcleo lipídico (con ésteres de colesterol y fosfolípidos), una capa de tejido fibroso, células de músculo liso vascular (CMLV), matriz extracelular de tejido conectivo (incluye colágeno, proteoglicanos y fibras elásticas de fibronectina), y células inflamatorias como macrófagos, linfocitos T y mastocitos [13]. En los pacientes con VIH, la fisiopatología del desarrollo de la lesión ateromatosa presenta una serie de características histológicas que difieren de la población general, como es la rápida progresión de lesiones arteriales difusas circunferenciales con proliferación de CMLV, fibras elásticas y profusiones endoluminales. Además intervienen una serie de citoquinas cuyos receptores son correceptores del virus, el cual, necesita de estas proteínas de membrana para poder entrar en la célula [14].

1.1.1. Inicio del proceso de formación de la placa.

Nuestro conocimiento sobre la fisiopatología de la arteriosclerosis ha ido evolucionando en las últimas décadas debido a los numerosos estudios sobre la proliferación de las CMLV, los factores de crecimiento y la biología del lecho vascular. En los últimos años se ha hecho aparente el destacado papel de la inflamación en las diferentes fases del desarrollo de la placa aterosclerótica, desde el inicio hasta la rotura o fisura [15].

La formación de la placa de ateroma se inicia invariablemente en casi todos los individuos en la primera o segunda década de la vida, empezando a manifestarse clínicamente en la tercera y cuarta década. Su prevalencia se acrecienta de forma exponencial a partir de la quinta década, alcanzando su máximo impacto sanitario en la sexta, séptima y octava década de la vida (figura 3). Su repercusión clínica aparece generalmente de forma aguda, cuando se ocluye la arteria, produciendo un episodio isquémico.

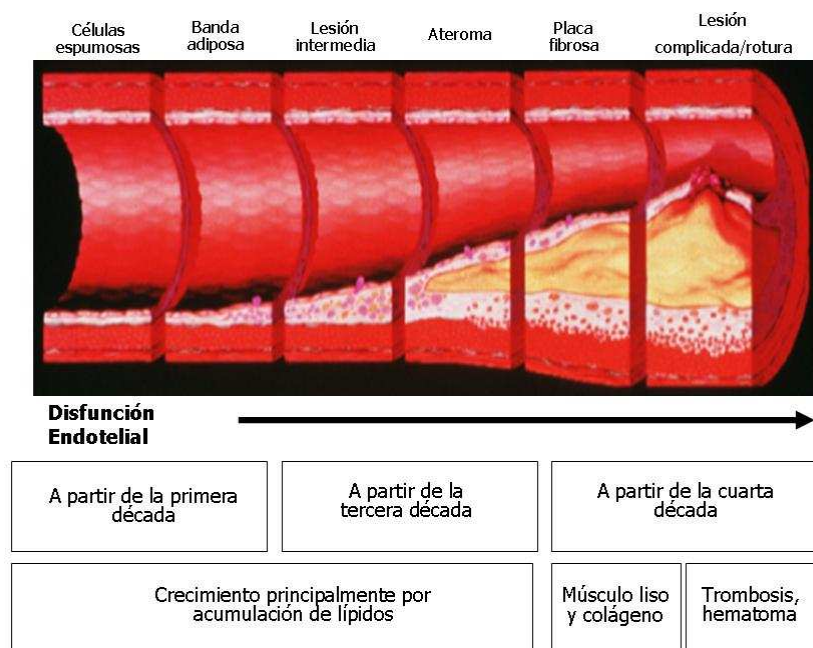


Figura 3. Cronología de la arteriosclerosis [16].

El endotelio desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis vascular, regulando la respuesta hemostática, inflamatoria y reparadora frente a un daño local. La disfunción endotelial es un evento clave en la patogenia de la arteriosclerosis. Aparece en las primeras etapas de la arteriosclerosis, antes incluso que cualquier otra manifestación clínica, y puede derivarse de numerosos factores, como la hiperlipemia, la hipertensión, la diabetes, la inflamación, el tabaquismo o el envejecimiento. El endotelio vascular expuesto de forma prolongada a estos agentes ve mermada su capacidad de adaptar su estado funcional para contrarrestar los efectos deletéreos que estos factores producen, lo que facilita el desarrollo de las lesiones. El endotelio alterado es más permeable a lipoproteínas plasmáticas, expresa niveles más elevados de moléculas de adhesión, a las que se unen células inflamatorias, y libera sustancias que inducen la quimiotaxis de éstas, como la proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein 1*). Además, sintetiza y secreta menor cantidad de moléculas vasoprotectoras como el óxido nítrico. Todo ello, facilita la infiltración de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) al espacio subendotelial y su posterior modificación por oxidación o glicosilación (en la diabetes), lo que impide que sean reconocidas por sus receptores. La presencia de LDL modificadas en el espacio subendotelial exacerba el proceso de disfunción endotelial y hace que el endotelio se muestre permeable a los leucocitos circulantes [17].

En la infección por VIH se ha comprobado que los pacientes, a través de interacciones entre citoquinas inflamatorias, proteínas virales y receptores celulares, pueden presentar disfunción endotelial. Se ha demostrado que estos pacientes presentan más disfunción endotelial que los controles sanos y los pacientes tratados con antirretrovirales presentan mayor disfunción endotelial aun que los no tratados [18]. La infección por el VIH en la pared arterial no solo se localiza en el espacio subendotelial sino que también afecta a las CMLV, las cuales expresan en su pared celular el receptor CCR-2 cuyo ligando es MCP-1. Las proteínas virales Tat y gp120 inducen en el endotelio vascular un aumento en la producción de endotelina-1, el vasoconstrictor más potente conocido [18,19].

El modelo de adhesión y transmigración o diapédesis de los leucocitos a través de la monocapa endotelial se compone de cuatro fases: el contacto y el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio activado son los primeros pasos del proceso, seguidos de la adhesión firme y la migración transendotelial (figura 4). La transmigración requiere un gradiente quimiotáctico a través de la monocapa. Varias quimioquinas participan en este

proceso, principalmente el MCP-1 interactuando con su receptor CCR-2. Numerosas evidencias experimentales demuestran la importancia del MCP-1 en el desarrollo de la lesión ateromatosa [20]. Se ha visto que el MCP-1 está altamente expresado en las placas ateroscleróticas. Además se ha demostrado que la delección del gen MCP-1 en ratones deficientes en el receptor de la LDL (LDLR) y en animales que sobreexpresan apolipoproteína (Apo) B, protege del desarrollo de arteriosclerosis inducida por la dieta ya que se reduce el reclutamiento de los macrófagos en la pared arterial. También, se ha demostrado que la delección de CCR-2 disminuye el infiltrado de macrófagos en la lesión y atenúa el desarrollo de arteriosclerosis en ratones deficientes en Apo-E [21].

En los pacientes infectados por el VIH, la infiltración de los leucocitos en el espacio subendotelial destaca por algunas particularidades propias de la infección. Los linfocitos infectados tienen mayor capacidad de penetración en el espacio subendotelial que los no infectados [22]. La explicación a este fenómeno podría ser un aumento de permeabilidad del endotelio vascular inducido por la proteína viral Tat [23]. Posteriormente, cuando el linfocito entra en el espacio subendotelial, establece contacto con las células endoteliales, lo que induce un aumento de la replicación viral [24], y por tanto, también un aumento en la expresión de proteínas virales en el espacio subendotelial (figura 4). Se ha demostrado que la incubación de células endoteliales en cultivo con la proteína Tat induce un aumento en la expresión de citoquinas atrayentes de los monocitos [25], en particular MCP-1 y aumento de las moléculas de adhesión, como VCAM-1 [26].

Este contacto inicial está regulado por las selectinas y sus ligandos, y depende del flujo sanguíneo para ser eficiente [27]. Con él, disminuye la velocidad de los leucocitos y facilita su rodamiento sobre la superficie endotelial, favoreciendo la adherencia al endotelio, lo que finalmente los detiene sobre la pared vascular [28]. Las selectinas (P, E y L) son glucoproteínas transmembrana de tipo I que se unen a hidratos de carbono presentes en sus ligandos de forma dependiente de Ca^{2+} . La selectina L se expresa en la mayoría de los leucocitos, mientras que la E y la P se expresan en células endoteliales activadas por estímulos proinflamatorios. La selectina P también se expresa en plaquetas activadas.

Aparte de las selectinas y sus ligandos, también las integrinas participan en estos contactos iniciales. Las integrinas constituyen una familia de 24 receptores heterodiméricos, compuestos cada uno de ellos por una subunidad α y otra β . Las

integrinas más importantes para la adhesión leucocitaria al endotelio y la quimiotaxis hacia los lugares de inflamación son miembros de la subfamilia $\beta 2$, particularmente CD11a/CD18 (LFA-1), CD11c/CD18 y la integrina específica de linaje mielóide CD11b/CD18 (Mac-1), así como la integrina VLA-4 ($\beta 1$ integrina) que se localizan en linfocitos. La mayoría de sus ligandos son proteínas transmembrana que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, aunque también pueden unirse a proteínas de matriz extracelular como fibronectina o fibrinógeno. Una de las principales funciones de las integrinas es la regulación de su actividad adherente independientemente de su grado de expresión en membrana. De esta manera, los leucocitos circulantes en sangre mantienen sus integrinas en conformación inactiva para evitar contactos inespecíficos con paredes vasculares no inflamadas, pero cuando encuentran un foco inflamatorio, se produce una rápida activación *in situ* de sus integrinas. Además cooperan con la selectina L estabilizando la fase de contacto transitorio y disminuyendo la velocidad de rodamiento [revisado en 29].

1.1.2. Desarrollo de la placa.

Una vez que los monocitos se encuentran en el espacio subendotelial se convierten en macrófagos expresan receptores scavenger (basura) o CD36, lo cual les permite fagocitar mejor las LDL modificadas, transformándose en células espumosas [13]. Estudios *in vitro* han demostrado que la expresión de este receptor aumenta en presencia de IPs. Además se ha observado que los IPs inhiben la expresión del receptor de LDL, haciendo que las LDLs se acumulen en la circulación y tengan más posibilidades de ser modificadas [9]. Las LDL pueden sufrir distintas modificaciones. En la infección crónica por VIH, estas lipoproteínas suelen glicosilarse en situaciones de resistencia a la insulina u oxidarse, debido a un aumento del estrés oxidativo por la presencia de F2-isoprostanos [30]. La presencia de LDL modificadas en el subendotelio exacerba el proceso de disfunción endotelial, facilita el reclutamiento de monocitos circulantes y condiciona la formación de células espumosas.

La fagocitosis de las LDLs es el primer paso de defensa del organismo contra la inflamación, minimizando los efectos deletéreos que causan las LDLs modificadas sobre las células endoteliales y CMLV. Sin embargo, la toxicidad de la carga lipídica provocará la apoptosis de estas células y la coalescencia de sus depósitos de colesterol contribuirán a la formación del núcleo lipídico de la placa (figura 4).

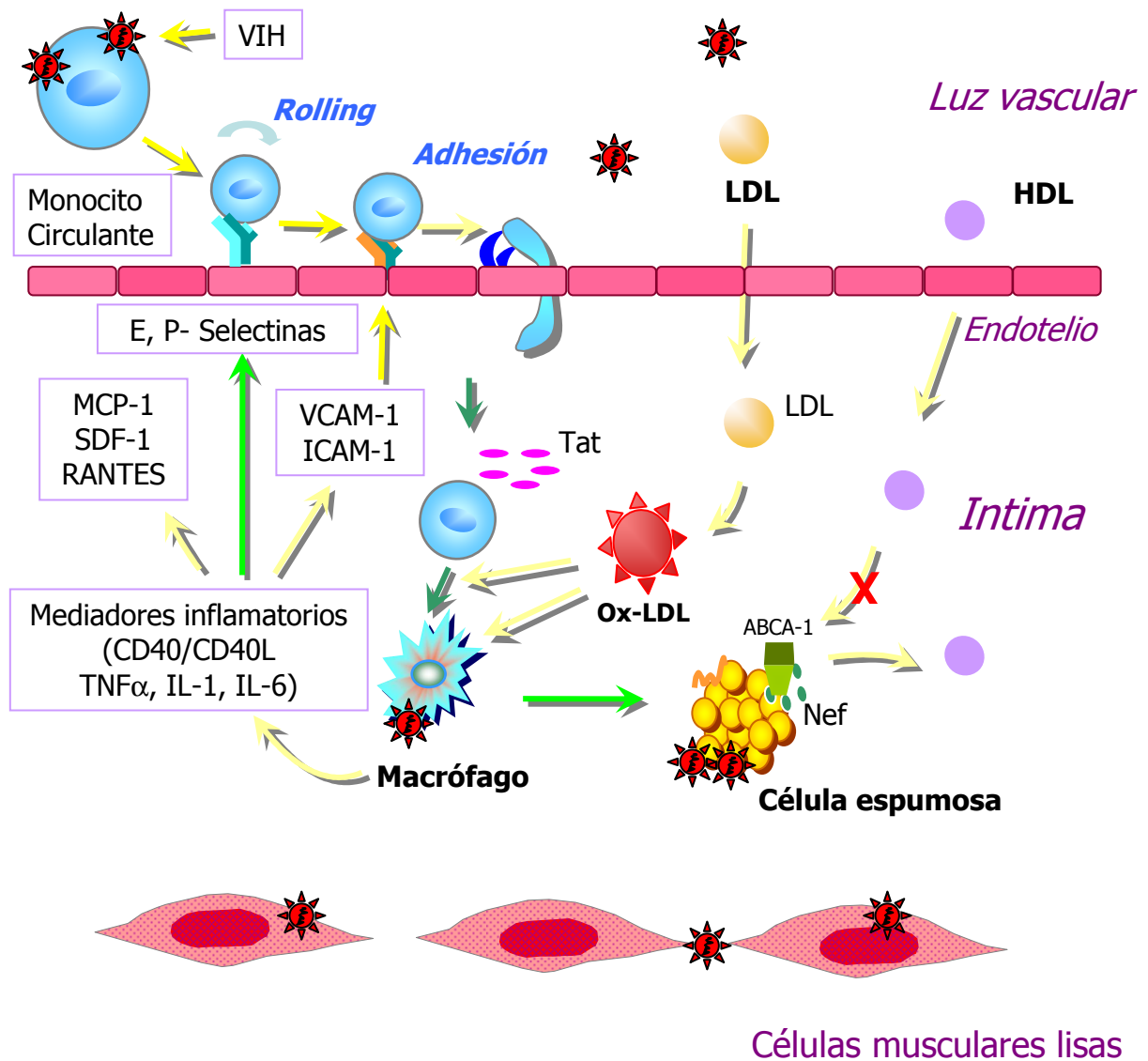


Figura 4. Infiltración de los monocitos al espacio subendotelial y formación de las células espumosas. El VIH infecta a monocitos, macrófagos y CMLV.

El transporte reverso de colesterol mediado por las HDLs debería de contrarrestar esta situación extrayendo el colesterol de las células espumosas, pero su receptor, denominado ABCA-1 (*Transportador ATP-binding cassette A1*), que permite el tránsito de colesterol hacia las HDLs, está bloqueado por la proteína viral Nef, no siendo capaz de realizar adecuadamente el transporte reverso de colesterol [31].

1.1.3. Ruptura de la placa.

Uno de las principales complicaciones del desarrollo de la placa de arteriosclerosis es la ruptura de ésta y la trombosis. Diferentes factores pueden contribuir a la ruptura de la placa de ateroma. Pero quizás el proceso más importante en el desarrollo de la vulnerabilidad de las placas es la destrucción de colágeno [32]. Los macrófagos son grandes inductores de enzimas de degradación de colágeno como las colagenasas y metaloproteasas (MMPs) [33]. Se ha demostrado que las MMPs se expresan en las lesiones arterioscleróticas mayoritariamente en las áreas más propensas a la ruptura, colocalizando con los macrófagos. Estudios *in vitro* han comprobado que los macrófagos son capaces de sintetizar MMPs [34] cuya inhibición en fases avanzadas de la arteriosclerosis puede proteger contra el desarrollo de placas inestables [35], lo que apoyaría la hipótesis de su implicación en el proceso de inestabilidad de la placa. La rotura de la placa pone en contacto elementos del interior de la placa con la luz arterial, iniciando el proceso de formación del trombo mediante la agregación plaquetaria. La activación plaquetaria provoca la liberación de diversas citoquinas proinflamatorias que, a su vez, reactivan los procesos ya iniciados por los macrófagos. Una de las citoquinas liberadas en este proceso es la citoquina RANTES, ligando principal CCR5, correceptor del virus del VIH. Se ha observado que las plaquetas de los pacientes infectados por el VIH liberan más RANTES que las de los controles sanos [36,37]. Por otro lado, los linfocitos T activados en la íntima sintetizan citoquinas proinflamatorias como el ligando de CD40 (CD40L), que al unirse a su receptor CD40 induce la producción de MMPs por los macrófagos [38], participando también de esta forma en la destrucción de colágeno en la placa.

Es bien conocido que tanto el virus VIH como el TAR pueden provocar lesiones en las células endoteliales que conllevan apoptosis y posterior muerte celular. El propio VIH puede aumentar la expresión de MMPs, que también podrían inducir ese daño endotelial. Además, algunos antirretrovirales inducen la formación de radicales libres y provocan disfunción mitocondrial en las células endoteliales [39].

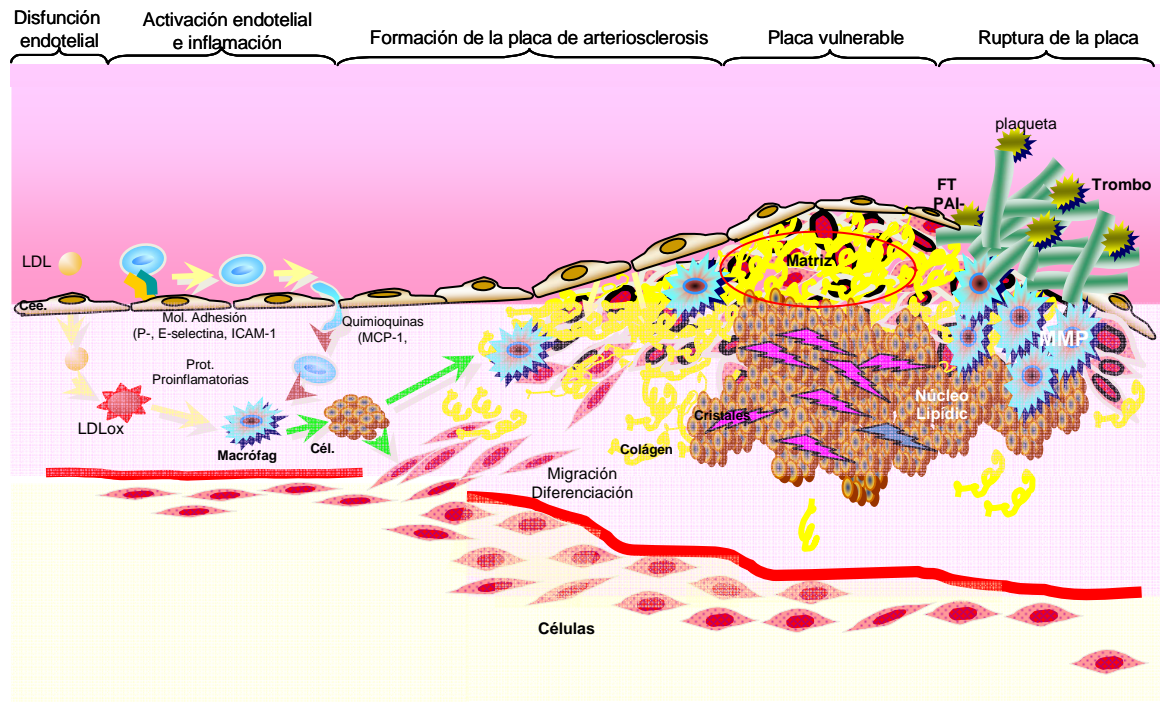


Figura 5. Proceso de formación de la placa de arteriosclerosis [40].

1.2. Mecanismos de reparación del daño vascular.

Como ya hemos comentado, la arteriosclerosis es una enfermedad inflamatoria sistémica caracterizada en estadios tempranos por la pérdida de la integridad del endotelio que tiene como resultado una disfunción endotelial, facilitándose la infiltración de las LDL al espacio subendotelial y el inicio de la formación de la lesión ateromatosa. Por tanto, la regeneración y el mantenimiento de una capa de células endoteliales intacta son fundamentales para la prevención del desarrollo de la placa de arteriosclerosis.

Clásicamente, se ha propuesto que la reparación de las zonas de daño endotelial dependería de la proliferación de las células endoteliales adultas adyacentes al daño. Sin embargo, durante los últimos años se ha demostrado que células derivadas de la médula ósea podían incorporarse al endotelio dañado y diferenciarse hacia células endoteliales.

Además, estas células son fundamentales para la formación de nuevos vasos sanguíneos, un mecanismo de defensa esencial para compensar la hipoxia que se genera por el incremento del grosor de la pared, y, por tanto, para el mantenimiento de la homeostasis vascular (figura 6).

Otro mecanismo implicado en el mantenimiento de la integridad del vaso es el transporte reverso de colesterol, un proceso por el cual las células eliminan el colesterol de su interior ya que les resulta tóxico. Ya en 1973, Ross Y Glomset propusieron que la arteriosclerosis es el resultado de una alteración entre el depósito y la retirada de colesterol de la pared del vaso después de un daño endotelial (figura 6) [41].

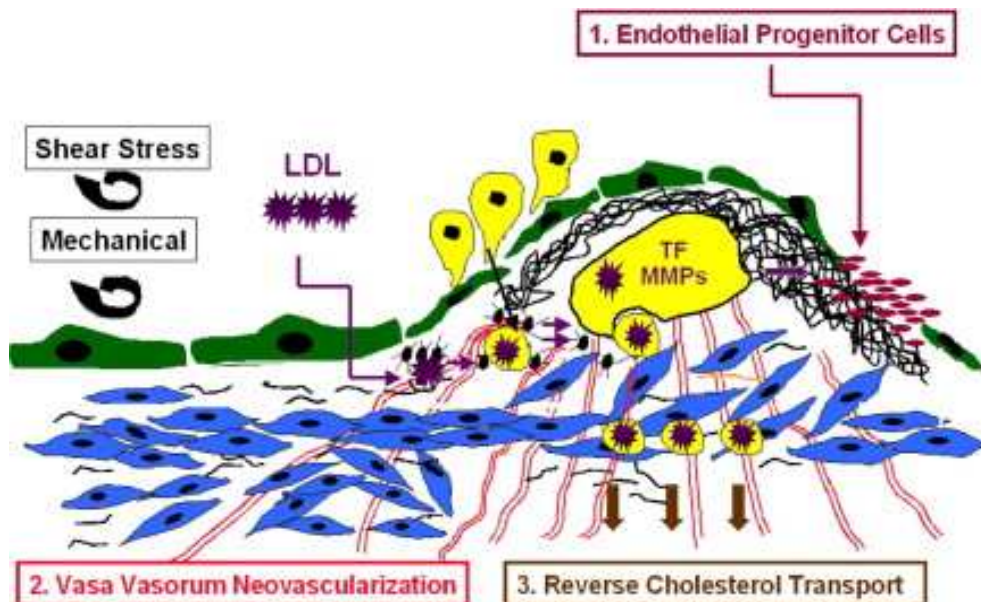


Figura 6. Mecanismos de defensa responsables del mantenimiento de la homeostasis vascular [41].

1.2.1. Papel de las células endoteliales progenitoras.

En los últimos años las células endoteliales progenitoras (EPCs) circulantes provenientes de la médula ósea han adquirido una gran relevancia debido al papel crucial que parecen desempeñar en el mantenimiento de la homeostasis del endotelio, estando implicadas en procesos de reendotelización y neovascularización. La primera evidencia

indicadora de la presencia de EPCs en la circulación adulta emergió en 1997, cuando Asahara y colaboradores observaron que células mononucleadas sanguíneas aisladas de individuos sanos adquirirían un fenotipo endotelial *in vitro* y se incorporaban en capilares *in vivo* [42]. Constituyen sólo del 1 al 5% del total de la población celular de la médula ósea y menos del 0,0001-0,01% de las células mononucleares periféricas circulantes [43].

1.2.1.1. Caracterización de las EPCs.

Las EPCs fueron caracterizadas vía expresión de CD34 y del receptor tipo 2 del factor de crecimiento endotelial (VEGFR-2); dos antígenos presentes en las células madre hematopoyéticas y en las células progenitoras endoteliales embrionarias.

La expresión del antígeno CD34 define el estado específico en el que se encuentra la célula progenitora disminuyendo la intensidad de su expresión cuando comienza su diferenciación [44, 45]. El CD34 participa en la adhesión *cell-to-cell* como ligando de la E-selectina con la capacidad de regular la tensión entre las células endoteliales contiguas [46]. Es bien conocido, que el antígeno de superficie CD34 además de expresarse en células endoteliales también puede presentarse en la membrana de células mesenquimales, epiteliales o células cancerígenas, por lo que su uso como único marcador de reconocimiento de EPCs sería inadecuado [47]. Es necesario encontrar un marcador adicional que sea capaz de discriminar los diferentes linajes celulares de EPCs.

El receptor tipo 2 del factor de crecimiento endotelial (VEGFR-2) o KDR, se expresa ampliamente en las células endoteliales y cardíacas siendo un buen discriminador entre las células que expresan CD34. Se identificó inicialmente en las células implicadas en vasculogénesis estando presente en aquellas con potencial para diferenciarse a células endoteliales maduras [48].

Las células progenitoras expresan también en sus membranas la glicoproteína 5-dominios transmembrana CD133. Se encuentra en un 20-60% de células de la médula ósea y la sangre que expresan CD34⁺, pero no en las células endoteliales maduras [49]. Su función principal es la organización topológica de la membrana mediante la regulación de la composición lipídica [50], aunque es posible que tenga otra serie de funciones que a día de hoy no han sido determinadas.

Además de los antígenos comentados anteriormente, las EPCs pueden expresar otros marcadores de células endoteliales, que también son utilizados para identificarlas, como son: el factor Von Willibrand (vWF) [51], CD31 [52] o CD144 (VE-cadherina), una molécula de adhesión fundamental para el ensamblaje de las células endoteliales adultas [53]. La combinación de estos marcadores de superficie contribuye en la capacidad que tienen las EPCs para diferenciarse en células maduras de endotelio [54].

Actualmente no existe una combinación de marcadores de caracterización de estas células aceptados y estandarizados por todos los laboratorios, ya que la mayoría de estos marcadores no son exclusivos de este tipo celular. Además, los datos de la literatura demuestran que no existe un único fenotipo que identifique a las células que participan en el proceso de revascularización. Aunque hay cierta discrepancia, se acepta que existen dos poblaciones de EPCs circulantes: precoces (CD34+, CD133+, KDR+), que contribuyen a la vasculogénesis sintetizando gran cantidad de citoquinas como VEGF, CXCL12/SDF-1 (*stromal-derived factor 1*), MCP-1 o CD40L (CD40 ligando); y tardías (CD34+, CD144+), cuya contribución se debe a su gran capacidad de proliferación (figura 7).

Mucho menos se sabe con respecto a las células progenitoras de músculo liso (SMPCs), células que expresan marcadores de células mesenquimales [como endoglina (CD105) o calponin] o proteínas contráctiles de músculo liso como la α actina (α -SMA), la cadena pesada de la miosina (SM-MHC) o la SM-22 α [55, 56]. El origen de las SMPCs no está claro. Algunos trabajos han identificado a las células mononucleares de sangre periférica CD14 +/ Endoglina+ como una fuente importante de SMPCs circulantes (figura 7) [57]. Además se ha sugerido que las EPCs y las SMPCs podrían tener un origen común, pudiendo cambiar sus fenotipos entre ellas en función de la situación ambiental.

Aunque varios estudios han demostrado la presencia de SMPCs con potencial para diferenciarse en CMLV en las lesiones arterioscleróticas [56], su papel en el proceso arteriosclerótico es todavía controvertido., y es que algunos datos que sugieren que las SMPCs podrían contribuir tanto al crecimiento de la neoíntima como a la estabilidad de la placa [56]. Las SMPCs son fundamentales para la creación de nuevos vasos, los cuales compensarán el estado hipóxico del interior de la placa y permitirán la eliminación de desechos, como el contenido lipídico, restaurando la homeostasis del vaso. Algunos estudios indican que una reducción en el número de SMPCs podría ser un factor causal en los síndromes coronarios agudos. Sin embargo, los vasos de placa de arteriosclerosis

tienen una pared frágil, susceptible de romperse, permitiendo el paso de los eritrocitos, lo cual aumenta la peroxidación lipídica y la activación de los monocitos/macrófagos de la placa [41].

Se han identificado numerosos fenotipos celulares que pueden participar en distintos pasos del proceso de regeneración y creación de los vasos sanguíneos, por lo que se ha establecido una definición de EPCs más universal que abarcaría a todas estas subpoblaciones celulares de múltiples orígenes y localizaciones [58].

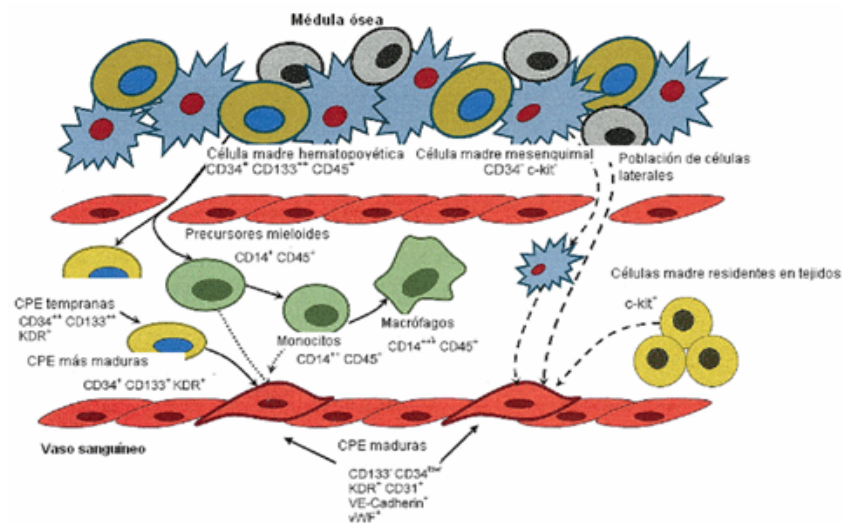


Figura 7. Caracterización de los distintos subtipos de EPCs [59].

1.2.1.2. Activación de las EPCs.

Las EPCs residen en el interior de la médula ósea, lugar que se caracteriza por bajas concentraciones de oxígeno y altos niveles de CXCL12/SDF-1, potente quimioattractante de las EPCs [60]. Se movilizan al exterior de la médula ósea en respuesta a una señal de hipoxia o a un daño producido en un tejido periférico, tras la producción de factores activadores tales como VEGF, eritropoyetina o el factor inducible de hipoxia-1 α (HIF-1 α) [60]. La liberación de EPCs de la médula ósea es también dependiente de la producción de óxido nítrico, así como de la actividad local de las MMPs. Por ejemplo, la MMP-9 que induce la liberación de citoquinas activadoras de células madre que provocan la movilización de EPCs quiescentes hacia el tejido dañado [61].

Una vez movilizadas, las EPCs deben dirigirse a las zonas de endotelización y neovascularización y diferenciarse [61]. Para su incorporación a estas áreas se requiere el contacto directo célula a célula mediante la expresión de moléculas de adhesión como por ejemplo, P-selectina, molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión plaquetaria a células endoteliales-1 (PECAM-1) e integrinas con el fin de facilitar su unión al endotelio vascular ya existente [61]. Además, las CMLV expuestas al flujo sanguíneo pueden secretar citoquinas que facilitan la captura de EPCs [61,62].

Una vez capturadas y firmemente adheridas en el lugar del vaso donde se ha producido el daño, las EPCs son capaces de secretar factores angiogénicos que facilitarán la migración de las células endoteliales o CMLV maduras circundantes [63].

1.2.1.3. EPCs y enfermedad cardiovascular.

En modelos animales se ha demostrado que la administración de EPCs a nivel local inhibe la formación de la placa aterosclerótica [64], sugiriendo que estas células podrían jugar un papel muy importante en la patogénesis de la arteriosclerosis y la ECV. La capacidad del vaso para mantener su homeostasis frente a un daño va a depender de que permanezca intacta su capacidad regeneradora. Tanto en modelos animales como en humanos, tras un IAM se observa un incremento en los niveles de EPCs. También se ha observado un incremento en el número de EPCs circulantes en pacientes con angina inestable respecto a aquellos con angina estable. Por tanto, la disfunción endotelial que se observa en pacientes con FRCV o ya enfermedad podría reflejar una disminución en la habilidad de renovar el endotelio por parte de las EPCs circulantes por lo que han sido propuestas como un FRCV. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que se puede producir un agotamiento en la producción de EPCs provocado por una médula ósea incompetente, lo cual se ha asociado a un mayor riesgo de padecer un primer evento cardiovascular en pacientes con diferentes factores de riesgo o incluso en sujetos sanos [65; 66].

La edad y el sexo masculino son FRCV no modificables. Diversos estudios han demostrado que mujeres sanas de mediana edad presentan niveles más elevados de EPCs que los varones del mismo rango de edad [67,68]. Junto con la edad y el sexo, el tabaco juega un papel muy importante como predictor de los niveles de EPCs. En un estudio en el que se analizaron los FRCV de manera individual en relación a las EPCs, se

observó que el tabaco era el mayor predictor del descenso de los niveles de EPCs, probablemente debido al aumento de la apoptosis de las células progenitoras prematuras [68]. En pacientes se ha demostrado que altos niveles de glucosa en plasma, concentraciones elevadas de colesterol LDL, así como la presencia de hipertensión se asocian con un descenso tanto en los niveles como en la funcionalidad de las EPCs [68, 69,70].

Pacientes con enfermedad arterial coronaria o ictus presentan un menor número de EPCs en comparación con voluntarios sanos de la misma edad. Además, estas EPCs obtenidas de la médula ósea fueron incapaces de llevar a cabo la neovascularización e incorporación en la vasculatura de ratones isquémicos [71]. Algunos estudios han demostrado que el número de EPCs tiene significado pronóstico en pacientes con y sin ECV. En pacientes con enfermedad arterial coronaria, un menor número de EPCs se asoció con un incremento de la severidad de la enfermedad y un mayor riesgo de muerte por causas cardiovasculares, eventos cardiovasculares graves, revascularización u hospitalización. También en pacientes en diálisis, los niveles altos de EPCs se asociaron con una menor mortalidad cardiovascular.

Estos datos sugieren que la valoración del número y funcionalidad de las EPCs podría ser un buen biomarcador subrogado de la arteriosclerosis. De hecho, a día de hoy las EPCs están consideradas como una de las prometedoras alternativas terapéuticas en la ECV [72].

1.2.2. Transporte reverso de colesterol. Funcionalidad de las HDL.

El transporte reverso de colesterol es uno de los principales mecanismos protectores frente a la arteriosclerosis. En 1968, Glomset utilizó este término para describir el regreso del colesterol periférico al hígado para su excreción en la bilis o heces. Todas las células necesitan colesterol pero, excepto las hepáticas, no son capaces de metabolizarlo, convirtiéndose la captación de colesterol por la HDL en un mecanismo fundamental para su supervivencia. Puesto que el colesterol libre es tóxico para las células, Ross y Glomset fueron los primeros en proponer que la arteriosclerosis es el resultado de un desequilibrio entre el depósito y la eliminación del colesterol en la arterias después de producirse el daño endotelial [73]. Los numerosos estudios clínicos y epidemiológicos que han demostrado una relación inversa entre los niveles de colesterol

HDL y la enfermedad cardiovascular han fortalecido aun más esta teoría [74].

El retorno del colesterol desde los tejidos periféricos al hígado se realiza mediante transporte pasivo [75], por interacción con el receptor SR-B1 (*receptor scavenger B1*) [76] o mediante el transportador ABCA-1, que es el sistema de transporte más eficiente responsable del 50% del eflujo de colesterol desde los macrófagos a la ApoA-1 pobre en lípidos [77]. Esta apolipoproteína es la proteína principal en la maduración de la HDL después de la esterificación. La HDL madura también es capaz de transferir colesterol esterificado a otras lipoproteínas mediante la enzima transportadora de colesterol (CETP), incrementando así la eficiencia del transporte reverso (figura 8).

En diversos estudios se ha demostrado que los pacientes infectados por VIH tienen alterado el eflujo de colesterol desde los macrófagos a la ApoA-I debido a una proteína accesoria propia del virus denominada proteína Nef que tiene como diana el transportador ABCA-1 [31].

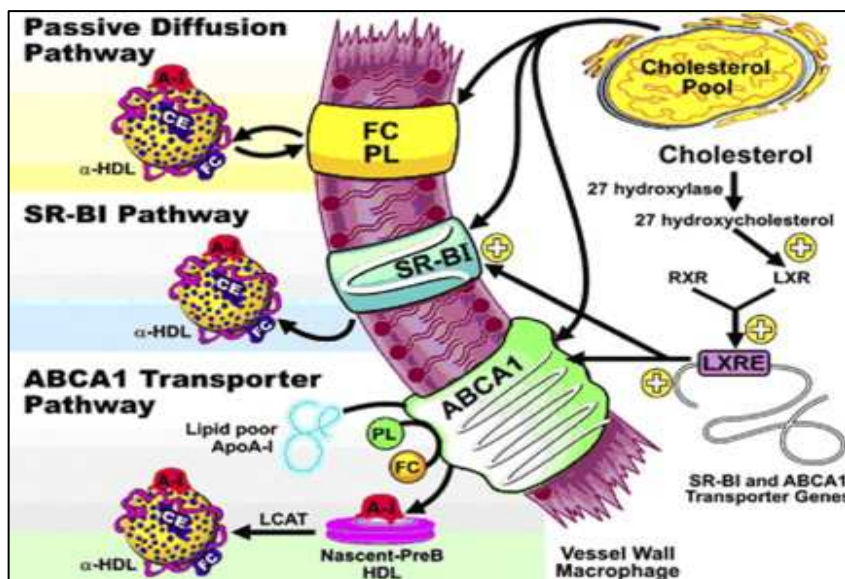


Figura 8. Transporte reverso de colesterol [41]. LCAT: lecitín-colesterol aciltransferasa; PL: fosfolípidos; FC: colesterol libre.

Aunque la principal función de la HDL es la salida de colesterol de las células, hay evidencias que demuestran que la HDL también es capaz de realizar otras actividades como reducir el estrés oxidativo vascular, mejorar la reendotelización mediante la activación y proliferación de EPCs [78] o ejercer un efecto anti-inflamatorio. Todos estos datos indican la importante participación de la HDL en la prevención de la ECV.

1.2.2.1. Clasificación de las HDL.

Las HDL, detectadas por primera vez en 1950 mediante ultracentrifugación analítica, son una de las principales lipoproteínas presentes en el plasma. Son un complejo macromolecular compuesto aproximadamente, por un 50% de lípidos y un 50% de proteínas [79].

Se caracterizan por ser las lipoproteínas plasmáticas más densas ($>1,063$ g/mL) y pequeñas. Las partículas de HDL varían en su contenido en lípidos, apolipoproteínas, enzimas, y proteínas transferidoras de lípidos, resultando en cambios de forma, densidad, tamaño, carga y antigenicidad [80]. Debido a esta gran heterogeneidad no existe una única clasificación para la HDL sino varias, en función del parámetro que se analice.

En función de su forma, las HDL pueden clasificarse como HDL discoidales o nacientes y HDL esféricas (figura 9a).

Según su tamaño, se clasifican en HDL_{3c}, HDL_{3b}, HDL_{3a}, HDL_{2a} y HDL_{2b}, siendo la HDL_{3c} la más pequeña, con un diámetro alrededor de 7,6 nm y las HDL_{2b} las más grandes, con un diámetro de 10,6 nm (figura 9b).

En relación a su densidad, las HDL se pueden clasificar como HDL₂, cuya densidad oscila entre 1,063 g/mL y 1,125 g/mL, y HDL₃, para las que presentan una densidad comprendida entre 1,125 g/mL y 1,210 g/mL (figura 9b).

Según su composición en apolipoproteínas, se denominan **LpA-I**, si sólo llevan ApoA-I; **LpA-II**, si transportan sólo ApoA-II, y **LpA-I/ LpA-II**, cuando transportan tanto ApoA-I como ApoA-II (figura 9c). Además, **Y-LpE**, cuando las HDL transportan ApoE y **LpA-IV**, cuando llevan ApoA-IV, aunque estas dos últimas son minoritarias en el plasma.

En función de su movilidad electroforética en gel de agarosa podemos clasificarlas en α -HDL, pre β -HDL y Y-HDL (figura 9d).

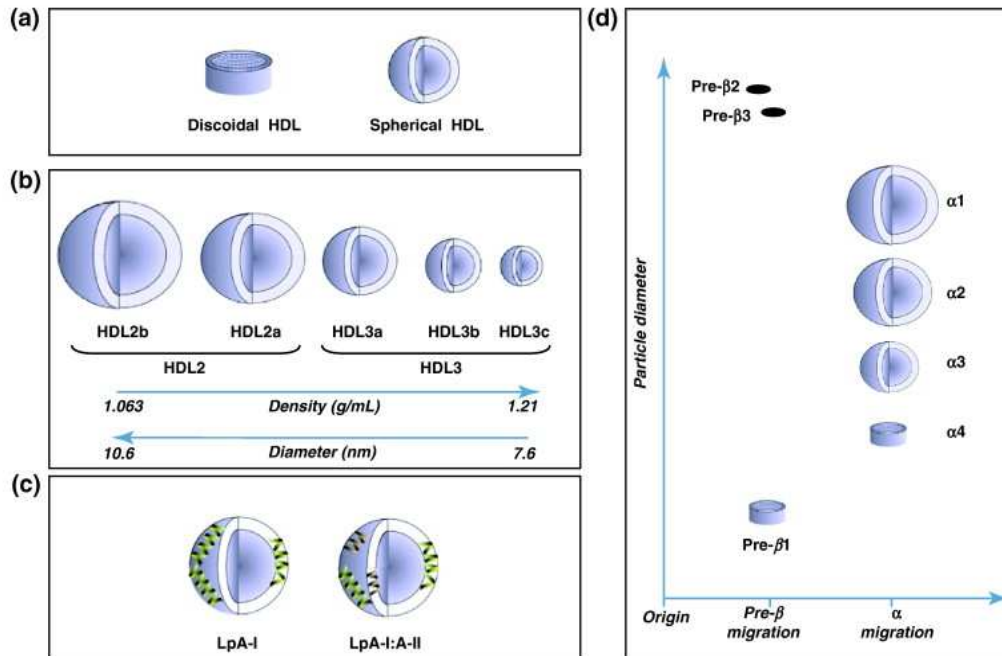


Figura 9. Clasificación de las HDL en función de su forma (a), densidad y tamaño (b), composición en apolipoproteínas (c) y movilidad electroforética (d) [81].

1.2.2.2. Metabolismo de las HDL.

El proceso de biosíntesis de las HDL es un mecanismo complejo que incluye la síntesis y secreción de las principales apolipoproteínas componentes de las HDL, la adquisición de lípidos extracelulares (fosfolípidos y colesterol) y el ensamblaje de la HDL madura [82]. La apolipoproteína más abundante y principal de las HDL es la ApoA-I que constituye aproximadamente el 70% del contenido proteico de la partícula. Es una proteína de 28 kDa que presenta una estructura anfipática que favorece la adquisición de lípidos. Esta estructura anfipática está íntimamente relacionada con la heterogenicidad del tamaño de las HDL, ya que permite cambios conformacionales dependiendo de la cantidad de lípidos ligados [83]. Se sintetiza tanto en el hígado como en el intestino, aunque se desconoce la proporción de síntesis de cada órgano. La ApoA-II es la segunda

apolipoproteína más abundante de las HDL que se sintetiza exclusivamente en el hígado. Estudios en ratones “Knock-out” sugieren que esta proteína es necesaria para una síntesis correcta y posterior metabolismo de las HDL [84].

Las recién sintetizadas apolipoproteínas de las HDL deben adquirir fosfolípidos y colesterol para ir generando la partícula madura de HDL. La salida de colesterol mediado por el transportador ABCA-1 desde las células es importante para la lipidación inicial de las HDL. Este transportador se expresa ubicuamente aunque parece ser que el localizado en el intestino y en el hígado es el responsable de la mayoría de la lipidación inicial de la ApoA-I libre. Dos moléculas de ApoA-I se unen alrededor de un núcleo hidrofóbico con una estructura de bicapa fosfolipídica dando lugar a la HDL naciente o discoidal, aunque estas moléculas se encuentran en muy baja concentración en el plasma ya que rápidamente se transforman en HDL maduras (figura 10) [85].

Las HDL nacientes maduran gracias a la lipólisis de partículas ricas en TG, principalmente lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones, mediante la acción de la enzima lipoproteína lipasa que actúa sobre estas partículas liberando lípidos superficiales, fosfolípidos y colesterol libre. Las HDL nacientes pueden intercambiar lípidos con las HDL ya maduras en un proceso de remodelado mediante la acción de la lipasa hepática, la CETP y la proteína transferidora de fosfolípidos (figura 10) [86].

Para completar la maduración total de la partícula es necesario que el colesterol libre se esterifique y forme el núcleo hidrofóbico característico de las HDL gracias a la acción de la enzima lecitín-colesterol aciltransferasa (LCAT). La HDL discoidal que contiene ApoA-I es el sustrato principal de esta enzima [87], la cual interactúa con el colesterol no esterificado de la HDL naciente dando como resultado ésteres de colesterol que se localizan en el núcleo de la partícula convirtiéndose así en una HDL esférica o madura (figura 10).

El paso final en el metabolismo de la HDL es la eliminación del colesterol que transporta la lipoproteína en el hígado, principalmente a través del receptor SR-B1. Este receptor es capaz de captar selectivamente colesterol, tanto libre como esterificado, pero no apolipoproteínas. Otra enzima implicada en la eliminación del colesterol transportado por la HDL es la enzima CETP que va a catalizar el intercambio de TG desde las LDL y las VLDL por colesterol esterificado de la HDL. Es una enzima clave en el metabolismo del colesterol ya que se ha demostrado que una deficiencia genética de CETP produce

un fenotipo asociado a concentraciones elevadas de colesterol HDL, partículas HDL más grandes y un catabolismo decelerado de la ApoA-I (figura 10) [88; 89].

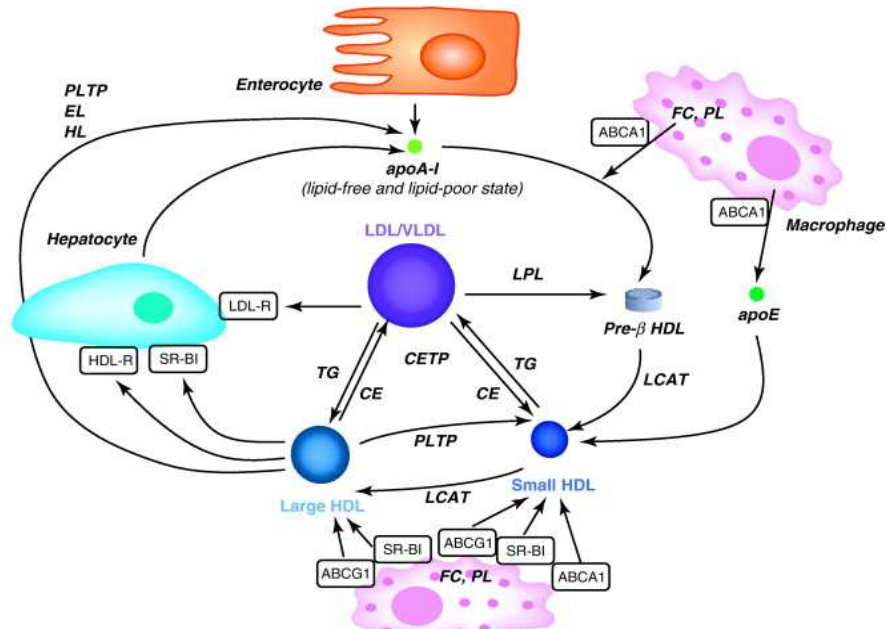


Figura 10: Dibujo esquemático del metabolismo de las HDL. LCAT: lecitín-colesterol aciltransferasa; PLTP: proteína transferidora de fosfolípidos; CETP: proteína transferidora de esteres de colesterol; LPL: lipoproteínlipasa; HL: lipasa hepática; EL: lipasa endotelial; CE: colesterol esterificado; TG: triglicéridos; PL: fosfolípidos; FC: colesterol libre [81]

1.2.2.3. Proteínas implicadas en el metabolismo de la HDL.

Apolipoproteína A-I.

La ApoA-I es el principal componente proteico de la HDL, de modo que la concentración plasmática de ApoA-I se correlaciona con la concentración de HDL. Se secreta principalmente en el hígado y en el intestino en forma de ApoA-I libre o pobre en lípidos. Juega un papel estructural central en las HDL, como se demuestra en los casos de deficiencia de ApoA-I, que se asocian con deficiencia de HDL. Participan en la unión y transporte de lípidos, eliminación del colesterol de células periféricas, activación de LCAT y reconocimiento de receptores en el hígado y en tejidos esteroideos.

Estudios realizados en ratones transgénicos, tanto de ApoA-I de ratón como de humana, demuestran que la sobreexpresión de ApoA-I da lugar a un incremento del colesterol HDL que es capaz de prevenir la arteriosclerosis [90].

La regulación de la ApoA-I ocurre a nivel transcripcional influenciada principalmente por la grasa de la dieta, ingesta de alcohol, estrógenos, andrógenos, hormonas tiroideas, ácido retinoico, glucocorticoides, fibratos, niacina y estatinas [91].

Apolipoproteína A-II.

Es la segunda apolipoproteína más abundante de las HDL. Se sintetiza principalmente en el hígado y en pequeñas cantidades en el intestino delgado.

Su función fisiológica en la partícula a día de hoy no está claramente establecida. El 20% de los pacientes con enfermedad coronaria presentan valores plasmáticos de ApoA-II superiores a los de sujetos sanos (40-60 mg/dL vs 30-35 mg/dL), sugiriendo que la proteína podría estar implicada en el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, un incremento de esta apolipoproteína provoca un desplazamiento de la paraxonasa (PON-1) en la HDL, reduciendo así la capacidad antioxidante de la partícula [92].

Apolipoproteína A-IV.

Es una glicoproteína que se sintetiza en los enterocitos del intestino delgado. Se encuentra principalmente asociada a la HDL y a la fracción no lipoproteica del plasma en situación de ayunas o a los quilomicrones si el sujeto se encuentra en período postprandial [93].

Se han propuesto diferentes funciones para esta apolipoproteína, incluyendo transporte lipídico, metabolismo de lipoproteínas y control de la ingesta. Diversos estudios han relacionado la ApoA-IV con inhibición de la oxidación de lípidos [94], sugiriendo que la proteína podría estar implicada en la protección frente al desarrollo de la arteriosclerosis. Además, posee un efecto estabilizador de la LCAT activando el eflujo de colesterol en cultivos celulares, por lo que puede ser una pieza importante del transporte reverso de colesterol. Se ha relacionado con la regulación de la actividad de la enzima lipoproteína lipasa y la concentración plasmática de TG [95].

Diversos estudios en pacientes con infección por VIH han relacionado aumentos en su concentración con el uso del TAR, mas concretamente con el uso de IPs. Además, dentro del grupo de pacientes VIH aquellos que presentan lipodistrofia presentan niveles elevados de la proteína con mayor frecuencia [96].

Apolipoproteína E.

Proteína que se sintetiza principalmente en el hígado, aunque también se ha descrito síntesis en el intestino, bazo, riñón, glándulas adrenales, cerebro y macrófagos [97]. Actúa como ligando del receptor de LDL permitiendo la captación de las lipoproteínas, en HDL promueve el eflujo de colesterol en ausencia de ApoA-I [98]. Su concentración plasmática en la población general es muy baja.

Los sujetos infectados por VIH presentan niveles elevados de ApoC-III, encargada de mantener el equilibrio dinámico entre las HDL, los quilimicrones y las VLDL, en las partículas de HDL que pueden perjudicar la interacción correcta entre la ApoE y sus receptores, acumulándose partículas ricas en ApoE que pueden llegar a ser altamente aterogénicas [99].

Serum amiloide A (SAA).

Familia de proteínas que forman parte de la estructura de la HDL y que aumentan su concentración durante la fase de reacción aguda que sigue a diferentes enfermedades o traumatismos. Pueden desplazar a la ApoA-I de la superficie de la HDL, pasando a ser uno de los componentes mayoritarios de la lipoproteína, lo cual causa alteraciones en la función protectora de la HDL y en sus componentes fisiológicos [100].

El SAA favorece la migración, adhesión e infiltración en tejidos de monocitos y leucocitos [101], y, está implicado en la movilización de calcio y síntesis de eicosanoides en monocitos humanos [102; 103].

La producción hepática de SAA se debe principalmente a la liberación de citoquinas proinflamatorias [104]. El SAA se libera al torrente sanguíneo donde se asocia con las HDL durante los periodos de respuesta inmune de fase aguda. Cuando los niveles de esta proteína se mantienen elevados de una manera crónica se generan una especie de depósitos en los principales órganos (pulmones, riñón e hígado) que conlleva

la formación una placa insoluble que puede contribuir al proceso de arteriosclerosis.

Lecitín:colesterol aciltransferasa (LCAT).

Enzima sintetizada en el hígado que se encuentra asociada mayoritariamente a la HDL aunque también es posible encontrarla en las VLDL y LDL. Cataliza la transferencia de dos ácidos grasos desde la lecitina al colesterol libre, formando colesterol esterificado y lisolecitina. Es una enzima clave en el transporte reverso de colesterol encargada de la transformación del colesterol libre en colesterol esterificado en la HDL. Cataliza la transformación de la HDL en una partícula madura. El colesterol que es esterificado por esta enzima proviene, en parte, directamente de las membranas celulares, aunque la fuente principal de colesterol libre para la reacción proviene de las LDL [105].

La ApoA-I es la principal molécula activadora de la LCAT, aunque no la única, mediando la fijación de la enzima a la lipoproteína e induciendo un cambio conformacional en la LCAT que favorece el acceso a los sustratos de la esterificación [106].

Ratones transgénicos deficientes para esta enzima se asocia a una fuerte disminución en la concentración de colesterol HDL, ApoA-I, ApoA-II, aumento de TG plasmáticos y acumulación de HDL nacientes de pequeño tamaño en el plasma [107]. Además se ha observado una reducción de las actividades PON-1 y acetilhidrolasa del factor activador plaquetario (PAF-AH), a pesar de tener los niveles de RNA mensajeros de estas proteínas en el hígado comparables a los de sus controles [108]. Por el contrario, la hiperexpresión de LCAT humana en ratones transgénicos provoca un aumento de HDL, produciéndose además un aumento inesperado en la susceptibilidad a la arteriosclerosis [109]. Este efecto podría explicarse por la acumulación de partículas HDL grandes, no funcionales, cargadas de lípidos y la eliminación de estas por parte del hígado podría dar lugar a partículas proaterogénicas.

Además de su implicación en el transporte reverso de colesterol, se ha encontrado que esta enzima tiene actividad antioxidante [110; 111] que podría tener relevancia para explicar la capacidad antioxidante y anti-inflamatoria de la HDL, aunque realmente el mecanismo no se conoce con exactitud existiendo una gran controversia al respecto [112].

Paraoxonasa (PON-1).

Enzima perteneciente al grupo de las esterasas tipo A capaces de hidrolizar diversos compuestos organofosforados. Se sintetiza y se secreta fundamentalmente en el hígado y en el plasma se va a encontrar asociada a HDL, especialmente en partículas que contienen ApoA-I y ApoA-II [113]. Es una enzima calcio-dependiente, siendo inhibida irreversiblemente al adicionar un quelante de calcio como es el ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA).

Parece ser que una de las funciones realizadas por la PON-1 es proteger de la inflamación a las células de la pared arterial destruyendo lípidos biológicamente activos de lipoproteínas oxidadas. Este efecto sobre las células de la pared arterial puede ser debido a la capacidad de esta enzima de hidrolizar peróxidos lipídicos en lipoproteínas oxidadas, especialmente hidroperóxidos de fosfolípidos [114], así como el factor activador de plaquetas (PAF) [115] y otros fosfolípidos con estructura similar que representan un elevado potencial inflamatorio. Además, se demostró que disminuye la acumulación de colesterol en los macrófagos mediante inhibición de la biosíntesis del mismo [116], por disminución de la oxidación de LDL vía *receptor scavenger* o CD36 [117], y también por estimulación del eflujo de colesterol mediado por las HDL desde los macrófagos [118]

La experimentación con animales deficientes en el gen de la PON-1 ha revelado una relación entre expresión de la enzima y formación de lesiones arterioscleróticas. Ratones knock-out para PON-1, además de ser susceptibles a los tóxicos organofosforados, son más susceptibles a la arteriosclerosis que sus controles no deficientes en el gen cuando son sometidos a dieta aterogénica. Tanto las HDL como las LDL aisladas de estos ratones deficientes para PON-1 son más susceptibles a la oxidación que las lipoproteínas de sus controles en ensayos *in vitro* [119].

Estudios realizados sobre esta enzima en pacientes VIH han postulado que la actividad de la PON-1 se encuentra disminuida en estos sujetos lo que podría deberse a; un aumento de radicales libres inducido por el propio virus que pueden unirse a la PON-1 circulante disminuyendo su actividad, bajas concentraciones de colesterol HDL y ApoA-I, el uso de tratamiento necesario para contrarrestar los efectos de la infección [120].

Lipoproteína asociada a la fosfolipasa A₂ (LpPLA₂).

Es una serina esterasa independiente de calcio asociada principalmente a LDL y en menor proporción a HDL. La LpPLA₂ o PAF-AH actúa hidrolizando el enlace éster sn-2 del PAF liberando acetato y lisofosfatidilcolina. También va a hidrolizar los ácidos grasos peroxidados de los fosfolípidos de las LDL mínimamente oxidadas evitando que las células endoteliales segreguen factores inflamatorios que promuevan la unión de los monocitos [121].

Al parecer la LpPLA₂ y la PON-1 actuarían conjuntamente en la protección a la oxidación de las lipoproteínas, como sugiere el hecho de que la LpPLA₂ no es suficientemente efectiva previniendo la oxidación en ratones deficientes de PON-1 [119].

En el contexto del proceso aterogénico la enzima LpPLA₂ podría jugar un papel dual, por un lado ejerciendo un efecto proinflamatorio, cuando se encuentra unida a la LDL, mediante la generación de lisofosfatidilcolina, y por otro lado, una acción antiinflamatoria, cuando forma parte de la composición de las HDL, mediante la degradación de fosfolípidos semejantes al PAF (PAK-like).

En condiciones de inflamación sistémica tales como el VIH y la arteriosclerosis, la actividad de la LpPLA₂ se encuentra incrementada debido probablemente a una respuesta patológica al incremento de los niveles de PAF y de fosfolípidos oxidados con actividad PAF-like [122].

Proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP).

Es una glicoproteína de 79 kDa miembro de la familia de proteínas transferidoras de lípidos que va a ser secretada al plasma desde diferentes tejidos circulando asociada principalmente a la HDL donde promueve el intercambio de ésteres de colesterol y TG, y en menor cuantía fosfolípidos, hacia las LDL y VLDL [123]. El efecto de la acción de CETP sobre las HDL tiene como resultado la eliminación de colesterol esterificado, enriquecimiento en TG, y reducción del tamaño de la partícula. Va a estar presente en humanos, primates, conejos y hámsters, pero no se encuentra en perros, caballos, cerdos o ratones [124].

Últimamente se ha prestado especial atención a las posibles propiedades antiaterogénicas de esta enzima, debido a su papel en el transporte reverso de colesterol. Pero por otra parte, su acción de aumentar el colesterol LDL/VLDL y aumentar el contenido de TG en la HDL (se va a asociar a un mayor catabolismo de la HDL por la lipasa hepática) podría ser proaterogénica [125]. En la última década la utilización farmacológica de inhibidores de CETP ha conseguido aumentar los niveles de colesterol HDL pero el efecto de este aumento sobre el riesgo de enfermedad coronaria plantea serias dudas acerca de la viabilidad de esta medida [126].

Proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP).

Proteína que va a formar parte de la familia de proteínas transferidoras de lípidos que va a ser sintetizada principalmente en ovario, timo y placenta, y en menor cantidad en el resto de órganos, cuya función es facilitar el intercambio de fosfolípidos entre la HDL y la VLDL y entre distintas partículas de HDL.

Participa en el remodelado de la HDL mediante fusión de las partículas transformándolas en partículas grandes, pequeñas y ApoA-I libre [127].

Lipasas.

La **lipoproteína lipasa** pertenece a la familia de las triacilglicerol lipasas y está relacionada con el metabolismo de las partículas ricas en TG más que en referencia al de HDL. Cataliza la hidrólisis de TG, y fosfolípidos en menor medida, en los quilomicrones y las VLDL [97]. Se va a reducir el tamaño de estas partículas siendo necesaria la relocalización de los constituyentes superficiales de las mismas que en muchos casos son transferidos a las HDL.

La **lipasa hepática** es una enzima que se encuentra en la superficie de las células endoteliales del hígado encargada de la hidrólisis de fosfolípidos y TG [128; 129]. Actúa preferentemente sobre IDL y HDL. Su acción provoca el paso de partículas de HDL grandes a otras de menor tamaño, cuya única apolipoproteína es la ApoA-I [130]. El papel de esta enzima en la arteriosclerosis no está aun bien definido pero sí su influencia sobre las HDL en plasma [131; 132].

La **lipasa endotelial** se expresa en diversos órganos incluyendo hígado, placenta, pulmón y riñón. Enzima que tiene fundamentalmente acción fosfolipasa sobre la HDL participando así en su metabolismo.

1.2.2.4. Otras funciones biológicas de la HDL.

Como ya hemos comentado, aunque el transporte reverso de colesterol es la principal actividad de la HDL, también posee otras actividades como anti-inflamatorias, antioxidantes, citoprotectoras, vasodilatadoras, antitrombóticas y de protección frente a las infecciones a través de las cuales también podría ejercer su efecto anti-aterogénico.

Actividad anti-inflamatoria.

Hay cada vez más evidencias demuestran que la HDL tiene una capacidad anti-inflamatoria asociada al desarrollo de la placa aterosclerótica, principalmente en los primeros estadios, cuando los leucocitos circulantes del torrente sanguíneo pueden entrar en contacto con la superficie del endotelio y migrar al interior del vaso. Bajo condiciones normales, el endotelio es capaz de ejercer resistencia a la adhesión de los leucocitos. Sin embargo, ante un estímulo proinflamatorio como puede ser una dieta rica en grasas saturadas, la obesidad o la hipertensión, el endotelio activado por el incremento de los niveles de citoquinas circulantes no es capaz de evitar la adhesión y posterior migración de los leucocitos al interior del vaso.

Se ha demostrado que la HDL es capaz de inhibir la expresión de moléculas de adhesión inducida por citoquinas en las células endoteliales; es capaz de inhibir la activación y adhesión de los monocitos al endotelio resultado de la inhibición en la producción de citoquinas proinflamatorias; y de reducir la activación de los neutrófilos y su infiltración en la pared arterial (figura 11) [133].

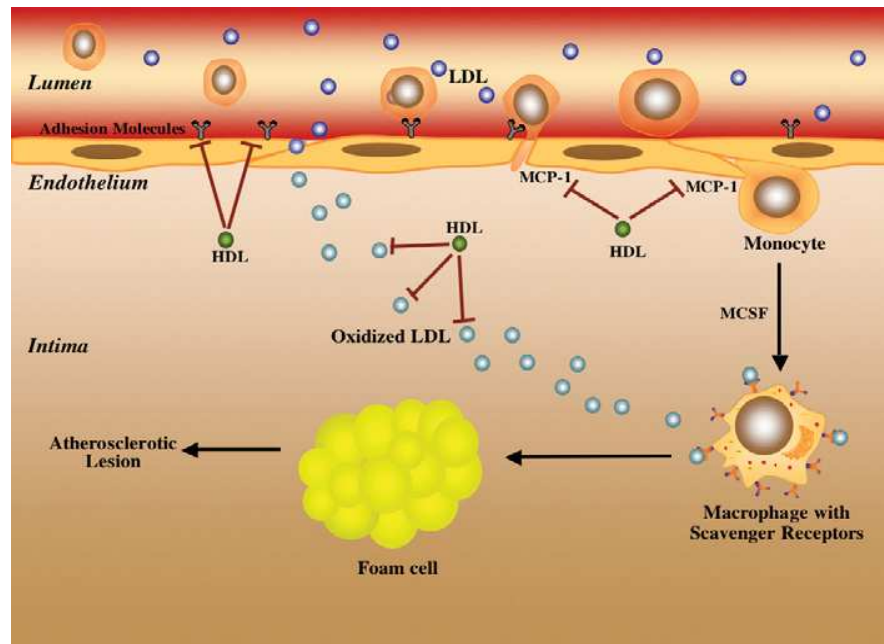


Figura 11. Actividad anti-inflamatoria de la HDL [134].

Por otro lado, la HDL juega un papel importante en la hidrólisis de lípidos oxidados proinflamatorios gracias a la asociación con las enzimas PON-1 y LpPLA₂. Este mecanismo es similar al efecto que ejercen estas enzimas en la función antioxidante de la HDL.

Actividad antioxidante.

Las propiedades antioxidantes de la HDL se definen como la habilidad de esta lipoproteína para inhibir la oxidación de las partículas LDL [135].

Hay numerosas evidencias que sugieren que la ApoA-I es la principal responsable de la función antioxidante de la HDL. Tanto ApoA-I como ApoA-II son capaces de reducir los ésteres de colesterol hidroperoxidados mediante un proceso que implica la oxidación simultánea de estas apolipoproteínas y que es independiente de la PON-1 [134].

La HDL es capaz de aceptar e inactivar fosfolípidos oxidados de las membranas celulares, así como de la LDL oxidadas. Para ello necesita estar asociada a enzimas como PON-1 y Lp-PLA₂. PON-1 cataliza la hidrólisis de los lípidos peroxidados evitando que se acumulen en la LDL. Bajos niveles de actividad de esta enzima se asocian con un

incremento del riesgo de ECV [136]. LpPLA₂ protege a la LDL de la oxidación mediante la hidrólisis de los fosfolípidos oxidados de cadena corta sn-2 acil. Otro mecanismo por el cual la HDL puede inhibir la oxidación de la LDL reside en su capacidad para eliminar e inactivar ácidos grasos oxidados de las LDL (figura 12) [135].

Todas estas habilidades de la HDL para evitar la oxidación de las partículas de LDL pueden verse alteradas bajo el marco de una inflamación sistémica como ocurre en el caso del lupus eritomatoso o en la artritis reumatoide [137].

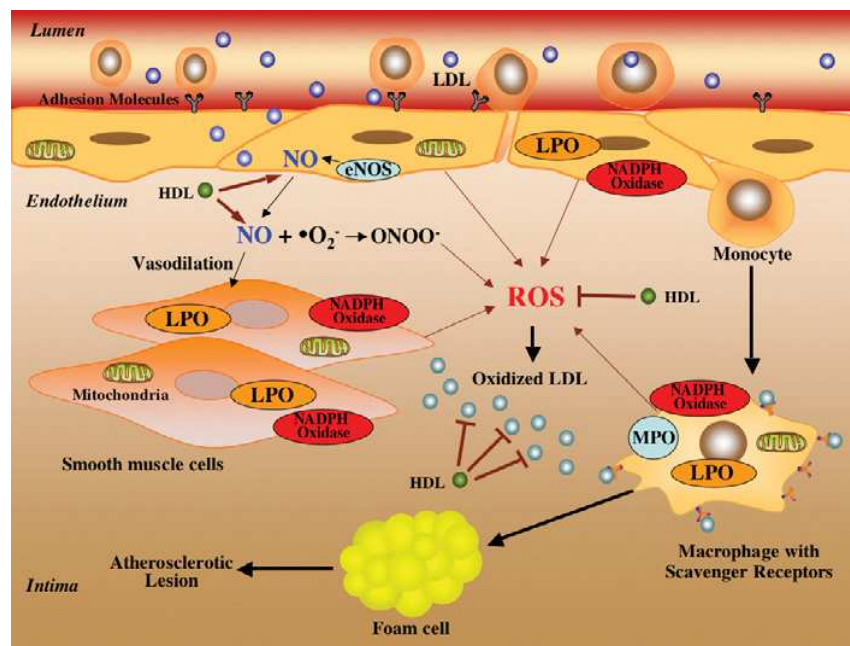


Figura 12. Actividad anti-oxidante de la HDL [134].

Actividad citoprotectora.

La HDL muestra una actividad citoprotectora que se atribuye principalmente a las apolipoproteínas, ApoA-I y Apo E, y a lisoesfingolípidos que lleva asociados y que previenen la apoptosis de las células endoteliales. Esta actividad antiaterogénica es paralela a la habilidad de la HDL para estimular la migración y supervivencia de células endoteliales mediada por el esfingofosfolípido-1 (S1P) [134].

Vasodilatación.

Las HDLs contribuyen en el mantenimiento de la función endotelial ya que van a estimular la liberación de óxido nítrico y la producción de prostaciclina en las células endoteliales [138]. En la producción de óxido nítrico está involucrado el receptor SR-BI, el cual activa una cascada de quinasas que activarán a la enzima sintasa endotelial de óxido nítrico.

Otra vía involucrada en el mantenimiento de la actividad de la sintasa endotelial de óxido nítrico en las células endoteliales está mediada por el transportador ABCG1 implicado en el eflujo de colesterol y en la maduración de las HDL.

Actividad antitrombótica.

Son diversos los mecanismos a través de los cuales la HDL protege frente a la trombosis arterial y venosa, como la activación de la síntesis de prostaciclina, la atenuación de la expresión de factor tisular y selectinas, la inhibición de la generación de trombina a través de la proteína C y, directamente, inhibiendo la agregación plaquetaria [139].

Actividad antiinfecciosa.

La HDL juega un papel muy importante en la unión y aclaramiento del lipopolisacárido (LPS) circulante en la bilis. Este efecto está mediado principalmente por la ApoA-I que va a reducir la expresión de CD14, receptor del LPS, en los monocitos [140].

2. OBJETIVOS

La arteriosclerosis es una enfermedad inflamatoria sistémica caracterizada en estadios tempranos por la pérdida de la integridad del endotelio o disfunción endotelial, facilitándose el infiltrado de monocitos sanguíneos al espacio subendotelial y el inicio de la formación de la lesión ateromatosa. Por tanto, la regeneración del endotelio y el mantenimiento de la homeostasis del vaso son fundamentales para la prevención del desarrollo de la placa de arteriosclerosis.

Los sujetos infectados por el VIH presentan una mayor incidencia de arteriosclerosis como consecuencia tanto de la infección del virus *per se* como de la toxicidad del tratamiento antirretroviral. Por tanto, en esta tesis nos hemos planteado la **hipótesis** de que en los pacientes con VIH podría existir una alteración de los niveles circulantes de EPCs, células fundamentales en la re-endotelización y en la formación de nuevos vasos sanguíneos, así como de la actividad anti-aterogénica de las partículas de colesterol HDL, como principales mecanismos de la reparación del vaso, que conduciría al desarrollo prematuro de la lesión.

Para abordar esta hipótesis, los **objetivos** concretos que nos hemos planteado son:

1. Comparar los niveles circulantes de los subtipos de EPCs CD34⁺/KDR⁺, CD34⁺/VE-cadherina⁺, y CD14⁺/endoglina⁺ de los pacientes con VIH con los de sujetos sin infección.
2. En los pacientes con VIH, analizar la relación entre los niveles circulantes de los subtipos de EPCs y las principales variables clínicas, así como con el tratamiento antirretroviral recibido.
3. Comparar el tamaño y la función (valorando la actividad anti-inflamatoria y antioxidante) de las partículas de HDL de los pacientes con VIH con la de sujetos sin infección y analizar su relación con las principales variables clínicas.
4. Comparar la concentración en ApoA-I, LCAT, Lp-PLA₂ y SAA (relacionadas con efectos anti/pro-aterogénicos) de las partículas de HDL aisladas de pacientes con VIH y de sujetos sin infección y estudiar su relación con su funcionalidad.

5. Estudiar la relación entre los niveles de los subtipos de EPCs, las partículas de HDL y la función de la HDL con el GIM-c, utilizado como marcador de la presencia de arteriosclerosis subclínica.

6. Determinar la relación entre los niveles circulantes de EPCs y la funcionalidad de la HDL.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Población de estudio.

En este estudio hemos incluido pacientes infectados por VIH, mayores de 18 años, atendidos en la Unidad de VIH del Hospital Clínico San Carlos de Madrid entre octubre de 2009 hasta Junio de 2011. Los criterios de exclusión fueron haber padecido algún evento cardiovascular (ictus, infarto de miocardio, o claudicación intermitente) previo y/o presentar enfermedad renal crónica.

Treinta y dos sujetos sin infección VIH, no fumadores y sin evidencia de ECV constituyeron el grupo control.

En el momento de su inclusión en el estudio, a todos los sujetos se les realizó un examen físico completo y se rellenó un cuestionario con datos como sexo, edad, medidas antropométricas (peso, altura y circunferencia de la cintura), presión arterial sistólica y diastólica (PAS/PAD), estatus de fumador, antecedentes familiares de ECV (definidos como ocurrencia de un evento cardiovascular importante en uno o más familiares de primer grado). Además, se revisó la historia clínica para calcular el tiempo acumulado de uso del TAR. También se calculó el índice de masa corporal (IMC). La presencia de hipertensión arterial (HTA), hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia se definió siguiendo las recomendaciones del Tercer Panel de Expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos [141].

El protocolo de este estudio cumple con los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos. Todos los sujetos incluidos en el estudio firmaron un consentimiento informado.

3.2. Obtención de sangre.

A todos los sujetos se les tomaron dos muestras de sangre en ayunas mediante punción venosa. El plasma se obtuvo a partir de la muestra recogida en tubos con EDTA 0,2 M como anticoagulante que se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Para la obtención de suero utilizamos el tubo de sangre sin anticoagulante, el cual se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Tanto el plasma como el suero se

aliquotaron y se guardaron congelados a -80°C hasta su uso.

3.3. Medidas de las variables bioquímicas.

La determinación plasmática de glucosa, c-HDL, Apo A-I, Apo B y TG se realizó mediante métodos enzimáticos estándar en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico San Carlos. La concentración plasmática de colesterol LDL se calculó utilizando la ecuación de Friedewald [142].

3.4. Determinación de los niveles circulantes de células progenitoras endoteliales (EPCs).

La cuantificación del número de EPCs en sangre se realizó mediante citometría de flujo siguiendo un protocolo descrito previamente [143]. Para cada sujeto se prepararon 4 tubos de polipropileno con 100 μL de sangre cada uno que se marcaron con los distintos anticuerpos específicos o con los correspondientes controles isotípicos (tabla 1)

Tabla 1: Anticuerpos utilizados para la cuantificación de las EPCs.

| Anticuerpo | Diana | Isotipo | Fluorocromo | Casa Comercial |
|------------|--------|----------------|-------------|-----------------|
| Anti-CD34 | Humano | IgG1 de ratón | PC7 | Beckman Coulter |
| Anti-CD144 | Humano | IgG2b de ratón | PE | R&D System |
| Anti-KDR | Humano | IgG1 de ratón | PE | R&D System |
| Anti-CD105 | Humano | IgG2b de ratón | PE | Beckman Coulter |
| Anti-CD14 | Humano | IgG1 de ratón | PC7 | Beckman Coulter |
| Anti-CD3 | Humano | IgG1 de ratón | ECD | Beckman Coulter |

La combinación de anticuerpos utilizada fue:

Tubo 1



10 μ L IgG1-PE / 10 μ L IgG1-PC7 / 10 μ L IgG2-PE / 10 μ L IgG2-PC7 / 10 μ L IgG1 ECD.

Tubo 2



10 μ L CD34-PC7 / 10 μ L CD144-PE / 5 μ L CD3-ECD.

Tubo 3



10 μ L CD34-PC7 / 10 μ L KDR-PE / 5 μ L CD3-ECD.

Tubo 4



20 μ L CD105-PE / 5 μ L CD14-PC7 / 5 μ L CD3-ECD.

Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Terminado este tiempo, a cada tubo se le añadieron 900 µL de solución de lisis (BD FACS Lysing solution, Beckton Dickinson), dejándola actuar durante 10 minutos en oscuridad. A continuación, las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 mL de tampón fosfato salino (en inglés PBS) otra vez a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron en 400 µL de PBS y se analizaron en el citómetro de flujo (FC500, Beckman Coulter).

Las EPCs se identificaron como negativas para CD3 y dobles positivas para CD34/KDR, CD34/CD144 o CD14/CD105. Los resultados se expresan como porcentaje de células CD3⁻/CD34⁺/KDR⁺, CD3⁻/CD34⁺/CD144⁺ o CD3⁻/CD14⁺/CD105⁺ en la región delimitada para las células mononucleares.

La configuración del aparato se optimizó diariamente usando microesferas fluorescentes de poliestireno (FlowCheck™ PC7 770/488, Beckman Coulter). El análisis de todas las muestras lo realizó el mismo operador que desconocía las características de los sujetos.

3.5. Análisis de las subclases de partículas HDL.

La determinación en plasma de las distintas subclases de partículas HDL (HDLp) se realizó mediante resonancia magnética nuclear espectroscópica (RMN) (LipoScience, Inc., Raleigh, NC) (figura 13). Este método permite determinar el tamaño de las HDLp y cuantificar su concentración en sangre. Las HDLp se agruparon en las siguientes categorías: HDLp grandes (8,8-13 nm de diámetro), HDLp medianas (8,2-8,8 nm de diámetro) y HDLp pequeñas (7,3-8,2 nm de diámetro) [144].



Figura 13: Aparato de resonancia nuclear magnética de la empresa LipoScience.

3.6. Aislamiento de LDL y HDL.

El aislamiento de las lipoproteínas LDL y HDL se realizó mediante ultracentrifugaciones secuenciales a 40.000 rpm, con un rotor TFT-1045 (Kontron) y a 4°C [145]. A 2 mL de suero de cada sujeto se les añadió una solución salina KBr para ajustar la densidad a 1,019 g/mL y se sometieron a ultracentrifugación durante 20 horas, con lo que se separaron los quilomicrones y las partículas VLDL+IDL que tienen una densidad inferior a 1,019 g/mL. A continuación se ajustó la densidad del suero a 1,063 g/mL y tras otra centrifugación de 20 horas se recogieron las partículas LDL (que tienen una densidad entre 1,019 y 1,063 g/mL). Para aislar las partículas HDL, la densidad del suero se volvió a ajustar a 1,210 g/mL y se realizó otra centrifugación de 40 horas. El cálculo de la cantidad de KBr necesario para ajustar el suero a la densidad deseada se realizó siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{KBr (g)} = [(\text{mL de suero}) * (\text{dens final} - \text{dens inicial})] / [1 - (0,312 * \text{dens final})]$$

Las muestras de LDL y HDL aisladas se alicuotaron y se congelaron a -80°C hasta su uso. Antes de cada experimento se dializaron las muestras en membranas específicas (tamaño 1 Inf Dia 8/32''- 6,3mm: 30M, Medicell Internacional Ltd) durante toda la noche a 4°C en PBS, se filtraron utilizando filtros con poros de $0,22\ \mu\text{m}$ (Millipore) y se cuantificó el contenido de colesterol mediante un ensayo enzimático colorimétrico (Spinreact, SA) (figura 14).

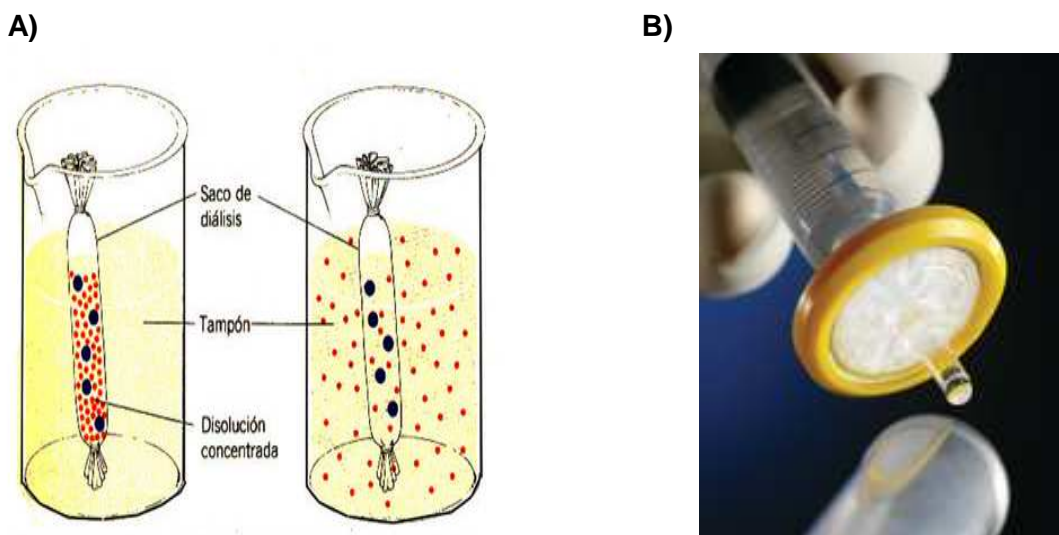


Figura 14: Dibujo representativo del proceso de diálisis (A) y filtro (poro $0,22\ \mu\text{m}$) utilizado para esterilizar las muestras y evitar posteriores contaminaciones (B).

3.7. Actividad anti-inflamatoria de la HDL.

3.7.1. Ensayo de quimiotaxis de monocitos.

Este experimento evalúa la capacidad de la HDL para interferir en la migración de los monocitos. Para ello, utilizamos una línea celular de monocitos humanos de leucemia monocítica (THP-1) adquiridos de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) de complementado con calor, 2 mM de L-Glutamina (BioWhittaker) y 50 U/ml de penicilina/estreptomina (BioWhittaker) a 37°C en una atmósfera al 5% de CO_2 y 75% de humedad.

La actividad de las HDL aisladas sobre la respuesta quimiotáctica de las células THP-1 se evaluó usando insertos Transwell® (6,5 mm de diámetro) con membrana de policarbonato (poro de 5 μm) (Costar). Un total de 10^5 células, resuspendidas en 100 μL de RPMI 1640 con 0,5% de SBF, se añadieron al pocillo superior del inserto y se incubaron con HDL (100 μg colesterol/mL) aisladas de los sujetos controles o de los pacientes a 37°C. Tras 30 minutos de incubación, al pocillo inferior se le añadieron 100 ng/mL de MCP-1 (Preprotech) y se permitió que las células migraran durante 2 horas a 37°C. Finalizado este tiempo, se recogió el contenido del pocillo inferior y se cuantificó el número de células que había en él con un citómetro de flujo (FC500, Beckman Coulter). Todas las muestras se analizaron en las mismas condiciones de flujo y tiempo. Todas las muestras se evaluaron por duplicado (figura 15).

La quimiotaxis específica se expresó como el porcentaje de células THP-1 que migraron en relación a las que lo hicieron en respuesta a MCP-1 solo (que se consideró como 100%).

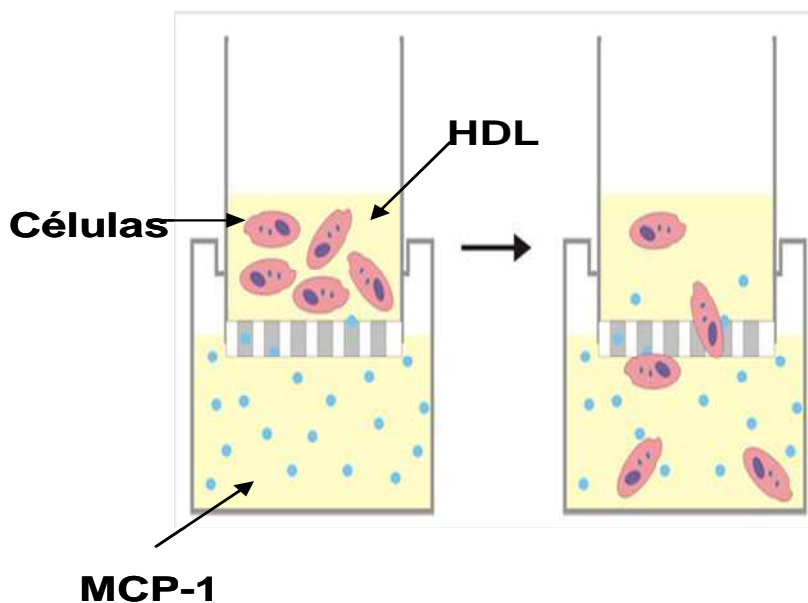


Figura 15. Dibujo representativo del proceso de quimiotaxis de monocitos humanos desarrollados en placas Transwell®.

3.7.2. Cuantificación de las moléculas de adhesión ICAM-1 y CD11b.

La expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y CD11b en la superficie celular se realizó mediante citometría de flujo. Para ello, las células THP-1, resuspendidas en medio RPMI-1640 con 0,5% de SBF, se preincubaron con HDL aisladas (100 µg colesterol/mL) durante 16 horas a 37°C y se activaron con TNF-α (10 ng/mL) durante 5 horas a 37°C. A continuación, las muestras se centrifugaron, se resuspendieron en PBS y se incubaron con anticuerpos específicos durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para detectar ICAM-1 se utilizó un anticuerpo anti-ICAM-1 humano de ratón conjugado con FITC (dilución 1:10, Beckman Coulter) y para detectar CD11b se utilizó un anticuerpo primario anti-CD11b humano de ratón (dilución 1:10, Beckman Coulter) y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con FITC (dilución 1:100, Beckton Dickinson). Para comprobar si había uniones inespecíficas se marcaron todas las muestras con controles isotípicos IgG1-FITC (Beckman Coulter).

Tras la incubación con los anticuerpos, las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en PBS y se analizaron en el citómetro de flujo (FC500, Beckman Coulter). Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas para cada anticuerpo.

3.8. Actividad antioxidante de la HDL.

3.8.1. Cuantificación de los niveles plasmáticos de LDL oxidada (LDLox).

El grado de oxidación de la lipoproteína LDL en el plasma se midió mediante el ensayo de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (en inglés TBARS) siguiendo un protocolo previamente descrito con algunas modificaciones [146]. En la peroxidación de los ácidos grasos insaturados de la LDL, se generan cetonas y aldehídos. Entre estos últimos está el malondialdehído (MDA) cuya concentración puede determinarse por su reacción con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) ya que, en condiciones de pH ácido y temperatura elevada, se genera un pigmento rojo. De cada sujeto del estudio se tomaron 200 µg de colesterol LDL y se incubaron con 125 µL de ácido tricloroacético al 5% y 1 mL de TBA al 0.6% en un volumen final de 3 mL. Los tubos se calentaron durante 45 minutos a 95°C. Una vez transcurrido el tiempo, se paró la reacción enfriando las muestras en hielo y se centrifugaron a 4.800 rpm durante 20 minutos. Doscientos µL del sobrenadante

se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 532 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se compararon con los obtenidos en una curva patrón de MDA. Los resultados se expresan en nmol de MDA/ mg de colesterol LDL (figura 16).

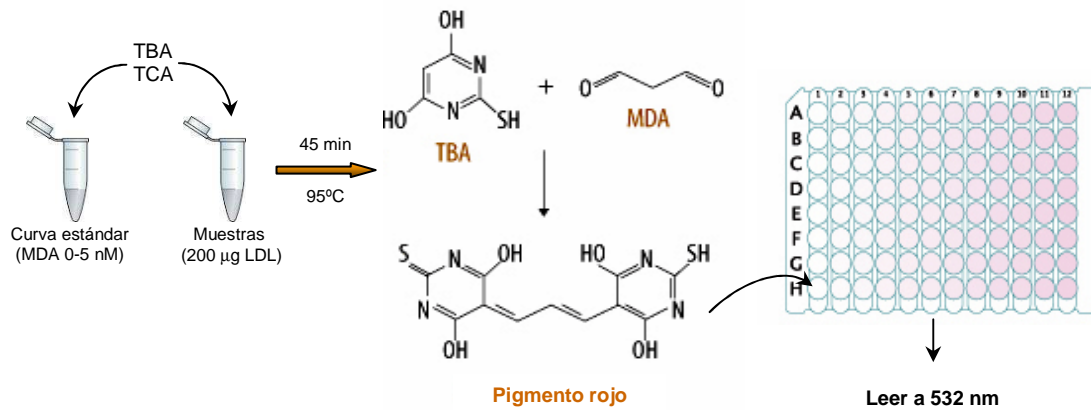


Figura 16. Esquema del ensayo de TBARS para la cuantificación de la oxidación de la LDL. TBA: ácido 2-tiobarbitúrico; TCA: ácido tricloroacético; MDA: malondialdehído.

3.8.2. Efecto de la HDL en la oxidación de la LDL.

Este ensayo se basa en la capacidad de la HDL para inhibir *in vitro* la oxidación de la LDL. En esta prueba, la oxidación de 150 µg de colesterol LDL humano obtenido comercialmente (Calbiochem) se inició mediante la adición de CuSO_4 5 µM (SIGMA) en presencia o ausencia de HDL aislada (0,05 mg de colesterol) a 37°C. Tras 24 horas de incubación, la reacción de oxidación se paró añadiendo una solución alcohólica del antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT) 10^{-4}M (SIGMA) y el grado de oxidación de la LDL se midió por el ensayo TBARS siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado anterior.

3.9. Cuantificación de las proteínas asociadas a la HDL.

La concentración de ApoA-I en una fracción de las HDL aisladas (0,1 mg colesterol) se midió utilizando un ensayo turbidimétrico (Spinreact, SA) adaptado para un autoanalizador Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics). La cantidad de LCAT, SAA y Lp-PLA₂ asociada a la HDL se cuantificó mediante ELISAs específicos disponibles comercialmente (LCAT: USCN Life Science, Inc; SAA: Invitrogen; Lp-PLA₂ PLAC™test, DiaDexus).

Además, se determinó la actividad de la Lp-PLA₂ asociada a la HDL. Para ello, las muestras se concentraron previamente utilizando columnas concentradoras de 50 KDa (Vivacon 500, Sartorius stedim) y la actividad se determinó mediante un ensayo comercial (Cayman Cematic, Inc.). Este ensayo evalúa la hidrólisis, por parte de la Lp-PLA₂, de un sustrato artificial, 2-tioPAF, liberando acetato y lisofosfatidilcolina con un grupo sulfhidrilo libre que es detectado mediante una reacción con ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzónico) (DTNB).



Figura 17. Imagen de una columna concentradora Vivaron de 50 KDa.

3.10. Medida del grosor íntima-media carotídeo (GIM-c).

El GIM-c se midió mediante eco-doppler utilizando un sistema de ultrasonido HD7 (Philips) con una sonda sectorial de 12 MHz según los criterios de la Sociedad Americana de Ecocardiografía [147]. De acuerdo con estas recomendaciones, el GIM-c se identificó como un patrón de doble línea visualizado mediante ultrasonografía en una imagen longitudinal de ambas paredes de las arterias carótidas comunes. Estas líneas se corresponden con dos estructuras anatómicas: la interfase luz-íntima y media-adventicia. Tras posicionar al paciente en decúbito supino, con el cuello en ligera hiperextensión y giro hacia la izquierda, el GIM-c se midió en la arteria carótida común derecha a 1 cm de la bifurcación carotídea, 1 cm proximalmente al bulbo carotídeo y en el origen de la carótida interna (1 cm distalmente a la bifurcación), en regiones libres de placa en las que se visualizó el patrón de doble línea. La resolución axial fue de 0,1 mm para la imagen en tiempo real. El GIM-c se midió en la pared más lejana, debido a su mayor fiabilidad. La placa se definió como una estructura focal invadiendo la luz arterial de al menos 0,5 mm o del 50% del valor del GIM-c circundante; también se consideró placa un grosor mayor del 1,5 mm medido desde la interfase media-adventicia a la interfase íntima-luz.

Se adquirieron imágenes de segmentos de al menos 10 mm en soporte informático para poder reproducir las medidas. Se utilizó el software de detección del GIM-c QLab (*Advanced Quantification Software*), el cual emplea un algoritmo inteligente que detecta parejas de píxeles a lo largo de cada línea de íntima-media escaneada basándose en múltiples criterios en lugar de simplemente gradientes de brillo en la imagen. Mediante la evaluación de parejas de píxeles a lo largo de cada línea escaneada en la región de interés seleccionada, el programa QLab proporciona una imagen espacialmente ponderada, siendo más difícil que se vea alterada por irregularidades aleatorias en la pared del vaso. Este programa ha sido validado exhaustivamente con especímenes histológicos y entre diferentes observadores [148].

Las medidas fueron realizadas por dos técnicos previamente entrenados. El estudio se comenzó cuando el índice de concordancia de las medidas del GIM-c realizadas de forma independiente por los dos observadores fue $\geq 0,80$, con un coeficiente de correlación intraclase 0,926 (0,849-0,965) y con una media de diferencias inter-observador de -0,00034 (-0,018-0,017 mm), sin ser estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,968$).

3.11. Análisis estadístico.

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias y se compararon mediante el test de χ^2 o prueba exacta de Fisher, en el caso de que más de un 25% de los valores esperados fueran menores de 5. Las variables cuantitativas que presentaban una distribución normal se muestran como su media \pm la desviación estándar (DE) y se analizaron mediante test paramétricos (t-student y ANOVA) para comparar dos o más grupos. Las variables cuantitativas que no seguían una distribución normal se presentan con mediana (rango intercuartilo) y se analizaron mediante los tests no paramétricos de Kruskal-Wallis o Mann-Whitney. La relación lineal entre variables continuas se analizó mediante el coeficiente de correlación paramétrico de Pearson o el de correlación no paramétrico de Spearman según correspondiera.

Dada la ausencia de una definición de HDL disfuncional, en este trabajo los sujetos que presentaron una HDL con una tasa de quimiotáxis y/o unos niveles plasmáticos de LDL oxidada superiores a las medianas de la muestra (67% de células migradas y 2,4 nmol MDA/mg LDL-colesterol, respectivamente) se consideraron como individuos con HDL disfuncional. La asociación entre los niveles circulantes de EPCs, la concentración alta de HDLp grandes (\geq 3er tercil, 5.9 $\mu\text{mol/L}$) o la funcionalidad de la HDL y el GIM-c (variable dependiente) se analizó con una regresión lineal multivariable. En el modelo se incluyeron los principales FRCV (edad, HTA, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia), así como las variables asociadas a la infección por VIH (tiempo de diagnóstico de la infección, tiempo de tratamiento).

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I de 0,05 ($P < 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software SPSS para Windows versión 17.0.

4. RESULTADOS

4.1. Características de los pacientes con VIH.

Para la realización de esta tesis doctoral hemos contado con una población de 203 pacientes VIH que asistían a la consulta de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. De ellos, 23 no habían recibido nunca TAR (grupo naïve) y 180 pacientes se encontraban recibéndolo en el momento de su inclusión en el estudio. Además, estudiamos 32 sujetos sin infección VIH y sin ningún factor de riesgo cardiovascular que sirvieron de grupo control.

Las principales características clínicas de los sujetos incluidos en el estudio se muestran en la tabla 2. Con respecto al grupo control, el grupo de pacientes naïve era similar en edad aunque predominaban más los varones. No se observaron diferencias entre ambos grupos en la PAS, o en los niveles plasmáticos de glucosa en ayunas o lípidos. Por el contrario, el grupo de pacientes tratados tenía mayor edad y valores significativamente más altos de PAS, colesterol total y TG. La mayoría de los pacientes en tratamiento tenían carga viral indetectable (<20 copias/mL).

Tabla 2. Características clínicas de los sujetos incluidos en el estudio.

| | Controles | Pacientes VIH | |
|---------------------------------|-------------|---------------|------------------|
| | (N=32) | Naïve (N=23) | Tratados (N=180) |
| Edad, años | 42 ± 10 | 40 ± 13 | 48 ± 10 # |
| Hombres, n (%) | 17 (61) | 20 (87) | 154 (86) |
| IMC, kg/m ² | 22,7 ± 2,4 | 22,9 ± 2,5 | 23,8 ± 2,9 |
| PAS, mmHg | 115 ± 9 | 112 ± 10 | 118 ± 17 |
| Glucosa, mg/dL | 90 ± 10 | 92 ± 8 | 98 ± 24 |
| Colesterol total, mg/dL | 179 ± 15 | 160 ± 29 | 192 ± 39 # |
| cHDL, mg/dL | 55 ± 18 | 44 ± 12 * | 51 ± 13 # |
| cLDL, mg/dL | 112 ± 20 | 93 ± 28 | 108 ± 34 |
| Triglicéridos, mg/dL | 97 (57-137) | 114 (74-131) | 170 (98-201) *# |
| Carga viral indetectable, n (%) | ---- | 0 (0) | 147 (83) # |
| Linfocitos CD4, cel/mL | ---- | 543 (371-672) | 576 (391-735) |
| Tiempo diagnóstico VIH, años | ---- | 5 (1-30) | 12 (5-18) |
| Tiempo con ITIANs, años | ---- | ---- | 13 (5-21) |
| Tiempo con ITINANs, años | ---- | ---- | 3 (1-6) |
| Tiempo con IPs, años | ---- | ---- | 5 (0-8) |

Los datos se expresan como la media ± DE o la mediana (rango intercuartilo). *p<0,05 vs grupo control; #p<0,05 vs grupo naïve. PAS: presión arterial sistólica; IMC: índice de masa corporal; ITIANs: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; ITINANs: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IPs: inhibidores de proteasas.

4.2. Niveles de EPCs en pacientes infectados por el VIH.

Cada vez cobra más relevancia el papel de las EPCs como mecanismo responsable de la reparación/regeneración del daño endotelial. Por ello, nuestro primer objetivo fue cuantificar, mediante citometría de flujo, los niveles circulantes de EPCs (CD34⁺/KDR⁺, CD34⁺/VE-cadherina⁺ y CD14⁺/endoglina⁺) en nuestra población de pacientes VIH.

En comparación con los sujetos control, los pacientes infectados por VIH mostraron una disminución en el número de células CD34⁺/KDR⁺ [0,08% (0,04% - 0,14%) vs 0,02% (0,01% - 0,03%), $p < 0,01$] y CD34⁺/VE-cadherina⁺ [0,07% (0,04% - 0,11%) vs 0,03% (0,02% - 0,05%), $p < 0,01$]. Por el contrario, los niveles de células CD14⁺/endogлина⁺ tendieron a ser menor en los pacientes con VIH que en los sujetos control [3,2% (1,7% - 5,1%) vs 2,1% (1,2% - 3,7%), $p < 0,067$] aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística.

En nuestra cohorte de pacientes con VIH, el FRCV más frecuente fue el tabaquismo (44,5%), seguido de la hipercolesterolemia (colesterol > 200 mg/dL) (37,2%), la hipertensión (16,5%) y la diabetes mellitus (9,5%). Aunque en la población general, la presencia de FRCV se ha asociado con una disminución del número de EPCs circulantes, en nuestra población de pacientes con VIH no observamos diferencias significativas entre los niveles de ninguno de los subtipos de EPCs entre hombres y mujeres, o entre pacientes con y sin los FRCV analizados (figura 18).

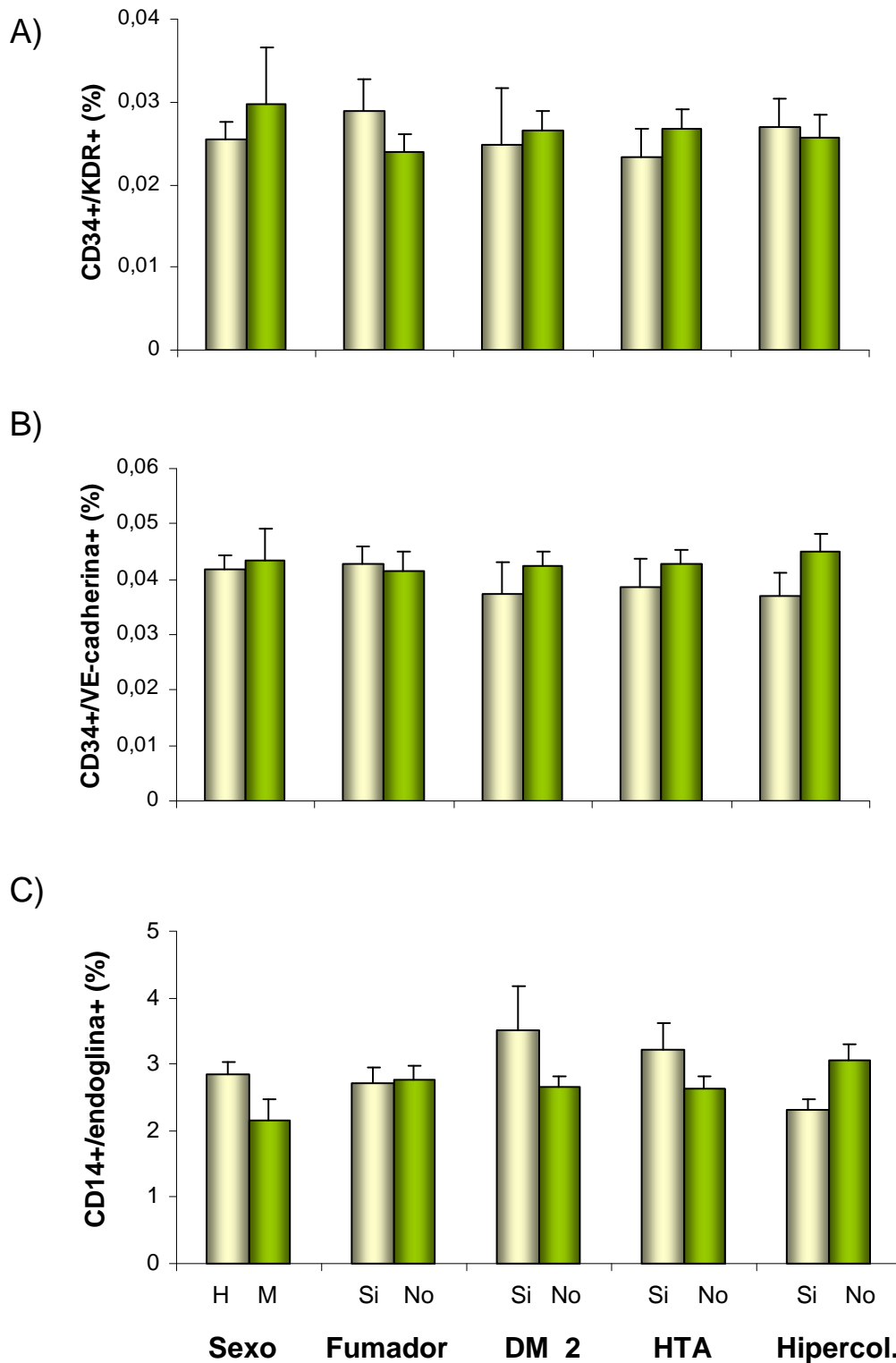


Figura 18. Niveles de células CD34⁺KDR⁺ (A), CD34⁺VE-cadherina⁺ (B) y CD14⁺endoglina⁺ (C) en pacientes VIH según la presencia de factores de riesgo cardiovascular. Los resultados se expresan como la media ± DE. H: hombre; M: mujer; DM2: diabetes mellitus tipo 2; HTA: hipertensión arterial; Hipercol.: hipercolesterolemia.

Sin embargo, hubo importantes diferencias en los niveles de EPCs entre los pacientes con VIH con y sin TAR. Como se observa en la figura 19, los pacientes naïve al tratamiento presentaron un número de células CD34⁺/KDR⁺, CD34⁺/VE-cadherina⁺ y CD14⁺/endoglina⁺ significativamente menor que los sujetos controles. En los pacientes en tratamiento, la cantidad de células CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/VE-cadherina⁺ fue aun menor, no ocurriendo así con las células CD14⁺/endoglina⁺, cuyos niveles fueron significativamente mayores que los del grupo naïve y similares a los del grupo control (figura 19).

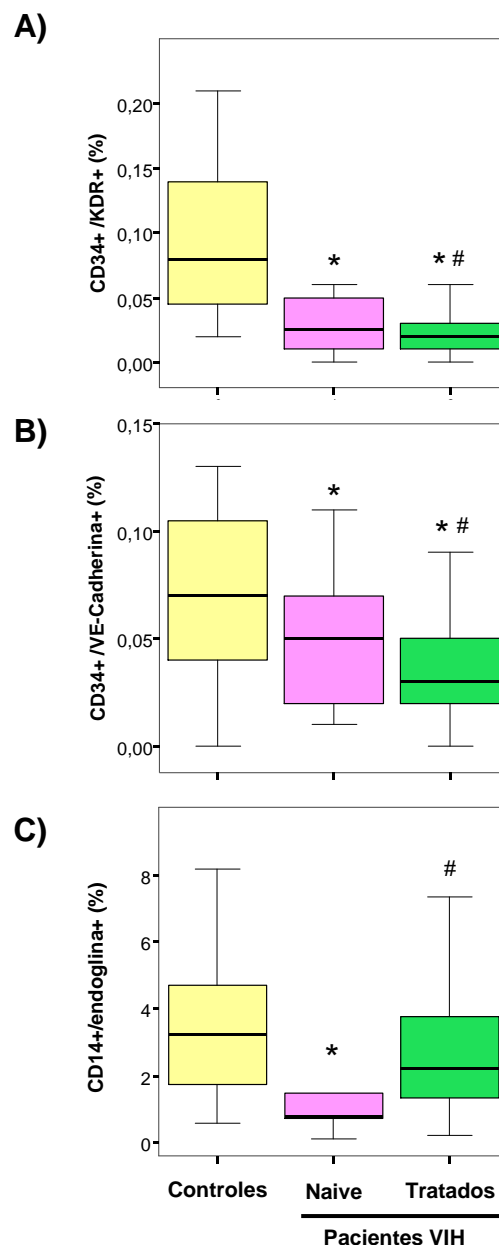


Figura 19. Niveles de células CD34⁺/KDR⁺ (A), CD34⁺/VE-cadherina⁺ (B) y CD14⁺/endoglina⁺ (C) en sujetos control y pacientes VIH naïve y con tratamiento antirretroviral. *p<0,05 vs controles; #p<0,05 vs grupo naïve.

La concentración de los distintos subtipos de EPCs no se relacionó con la cantidad de linfocitos CD4⁺ en los pacientes con VIH. Sin embargo, la carga viral se asoció positivamente con el número de células CD34⁺/KDR⁺ ($r = 0,159$; $p=0,029$) y negativamente con el de células CD14⁺/endoglina⁺ ($r = -0,220$; $p= 0,003$).

A continuación se realizó un análisis de regresión multivariante para valorar la importancia relativa de cada variable asociada de forma independiente con los niveles de EPCs. En el modelo se introdujeron aquellas variables que en el análisis univariado fueron estadísticamente significativas y/o clínicamente relevantes (variables relacionadas con los FRCV). Como se muestra en la tabla, el TAR fue la única variable que se mantuvo como un factor independiente de niveles de células CD34⁺/KDR⁺ y CD14⁺/endoglina⁺ (tabla 3).

Tabla 3. Análisis multivariante que muestra las variables independientes en relación a los niveles de EPCs en los sujetos VIH.

| | CD34 ⁺ /KDR ⁺ | CD34 ⁺ /VE-cadherina ⁺ | CD14 ⁺ /endoglina ⁺ |
|-------------------------------|-------------------------------------|--|---|
| | Coefficiente β (IC 95%) | Coefficiente β (IC 95%) | Coefficiente β (IC 95%) |
| en TAR | 0,53 (0,29-0,99) * | 0,83 (0,57-1,20) | 2,19 (1,48-3,25) ** |
| Edad | 1,00 (0,98-1,02) | 0,99 (0,98-1,00) | 1,01 (1,00-1,02) |
| Sexo | 1,24 (0,75-2,04) | 1,05 (0,78-1,42) | 0,83 (0,61-1,13) |
| HTA | 1,16 (0,72-1,88) | 0,93 (0,70-1,24) | 1,11 (0,83-1,50) |
| Diabetes | 0,71 (0,39-1,29) | 1,02 (0,71-1,47) | 1,18 (0,80-1,76) |
| Hipercolesterolemia | 1,04 (0,72-1,51) | 0,85 (0,68-1,06) | 0,85 (0,68-1,07) |
| Tiempo diagnóstico VIH | 1,00 (0,98-1,03) | 1,01 (0,99-1,02) | 1,01 (0,99-1,02) |

* $p<0,05$; ** $p<0,001$. IC: intervalo de confianza 95%; TAR: tratamiento antirretroviral; HTA: hipertensión arterial.

4.2.1. Asociación entre los niveles de EPCs y el GIM-c.

Diversos trabajos han demostrado que la disminución en el número de EPCs se asocia con el desarrollo de un primer evento cardiovascular, incluso en sujetos sanos [149]. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue investigar la asociación entre el número de células CD34⁺/KDR⁺, CD34⁺/VE-cadherina⁺ y CD14⁺/endogлина⁺ y el GIM-c en nuestros pacientes con VIH, considerado como un marcador de aterosclerosis subclínica. Para ello, los pacientes se clasificaron en dos grupo: pacientes con niveles de EPCs por debajo del percentil 75 (<p75) y pacientes con niveles de EPCs iguales o superiores al percentil 75.

Como se muestra en la tabla 4, no hubo diferencias significativas en la distribución de sexo, la edad, las variables bioquímicas relacionadas con los FRCV y los parámetros virales entre los pacientes con niveles más altos o más bajos de los distintos tipos celulares. Solamente los pacientes con niveles más bajos de células CD34⁺/KDR⁺ o más altos de CD14⁺/endogлина⁺ habían recibido durante mas tiempo tratamiento con ITIANs y/o IPs.

Tabla 4. Características clínicas de los paciente con VIH en relación a niveles bajos (<p75) y altos (≥p75) de los distintos subtipos de EPCs.

| | CD34 ⁺ /KDR ⁺ (%) | | CD34 ⁺ /VE-cadherina ⁺ (%) | | CD14 ⁺ /endogлина ⁺ (%) | |
|---------------------------------|---|-----------------|--|-----------------|---|------------------|
| | < p75 (N=129) | ≥ p75 (N=71) | < p75 (N=134) | ≥ p75 (N=66) | < p75 (N=137) | ≥ p75 (N=63) |
| Edad, años | 47 ± 10 | 46 ± 11 | 48 ± 10 | 45 ± 10 | 47 ± 11 | 50 ± 9 |
| Sexo, n (%) | 110 (85,3) | 61 (85,5) | 115 (88,8) | 56 (84,8) | 112 (81,8) | 60 (95,7) |
| Naïve, n (%) | 10 (7,8) | 10 (16,1) | 9 (6,7) | 11 (16,7) | 15 (10,9) | 3 (4,3)* |
| IMC, kg/m ² | 23,8 ± 2,5 | 23,5 ± 3,1 | 23,4 ± 2,7 | 24,1 ± 2,6 | 23,6 ± 2,8 | 24,2 ± 2,3 |
| Fumador, n (%) | 54 (41,9) | 34 (48,4) | 60 (44,8) | 29 (43,9) | 60 (43,8) | 26 (41,3) |
| PAS, mmHg | 116 ± 18 | 117 ± 17 | 118 ± 18 | 116 ± 16 | 116 ± 17 | 121 ± 17 |
| Glucosa, mg/dL | 98 ± 26 | 97 ± 18 | 96 ± 16 | 100 ± 34 | 97 ± 26 | 98 ± 16 |
| Colesterol total, mg/dL | 188 ± 41 | 186 ± 44 | 188 ± 41 | 185 ± 43 | 190 ± 43 | 184 ± 41 |
| Triglicéridos, mg/dL | 133 (91-187) | 137 (102-203) | 131 (91-192) | 132 (100-205) | 133 (96-196) | 133 (104-228) |
| Carga viral indetectable, n (%) | 101 (78,3) | 48 (67,2) | 104 (78,2) | 43 (66,2) | 98 (71,5) | 53 (84,1) |
| Linfocitos CD4, cel/mL | 523 (394-725) | 504 (314-665) | 530 (386-747) | 494 (340-591) | 530 (401-747) | 510 (373-686) |
| Tiempo diagnóstico VIH, años | 11,0 (4-16,5) | 10 (3-19) | 11,0 (4,0-17,0) | 10,0 (4,0-17,0) | 10,0 (4,0-17,0) | 11,0 (8,0-19,0) |
| Tiempo en TAR, años | 6,9 (2,1-12,0) | 4,1 (1,4-10,2) | 6,4 (2,0-12,0) | 5,6 (1,1-10,0) | 4,5 (1,4-10,7) | 7,8 (2,9-11,7) |
| Tiempo con ITIANs, años | 12,8 (4,2-20,7) | 7,5 (2,0-19,8)* | 10,8 (3,7-20,9) | 10,6 (2,0-16,8) | 8,1 (2,7-19,9) | 15,2 (5,7-20,9)* |
| Tiempo con ITINANs, años | 2,0 (0-5,6) | 1,6 (0-2,9) | 2,0 (0-4,9) | 1,5 (0-3,3) | 1,7 (0-3,9) | 2,6 (0,3-6,7) |
| Tiempo con IPs, años | 2,6 (0-8,4) | 0,6 (0-5,0)* | 2,6 (0-6,8) | 0,3 (0-8,1) | 2 (0-6,5) | 2,3 (0-12,5)* |

Los datos se expresan como la media ± SD o la mediana (rango intercuartilo). *p<0,05 vs grupo con niveles más bajos del mismo tipo celular. IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; TAR: tratamiento antirretroviral de gran actividad; ITIANs: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; ITINANs: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IPs: inhibidores de proteasas. p75 CD34⁺/KDR⁺ = 0,05; p75 CD34⁺/VE-cadherina⁺ = 0,06; p75 CD14⁺/endogлина⁺ = 3,78.

Los pacientes con niveles más bajos de células CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/VE-cadherina⁺ o más altos de CD14⁺/endogлина⁺ presentaron un mayor GIM-c, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística (figura 20). El análisis de regresión lineal reveló que el GIM-c se asociaba significativamente con la edad ($r=0,471$; $p<0,001$), PAS ($r=0,278$; $p<0,001$), la glucosa ($r=0,272$; $p<0,001$), el tiempo de diagnóstico de VIH ($r=0,207$; $p=0,003$), y el tiempo acumulado de tratamiento con ITIANs ($r=0,215$; $p=0,003$) o IPs ($r=0,163$; $p=0,024$).

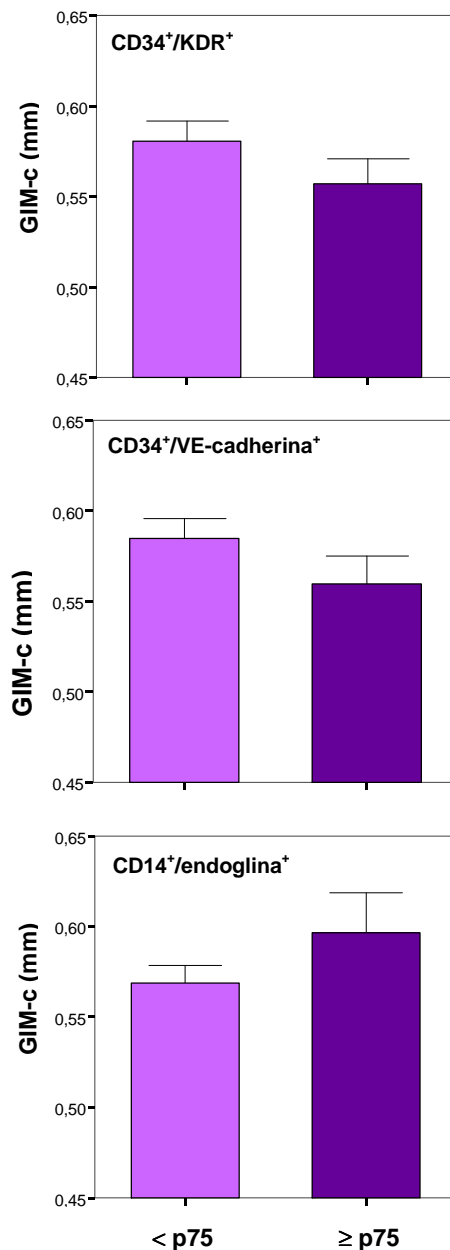


Figura 20. Medida del GIM-c en los pacientes con VIH en función de sus niveles de EPCs. Los datos se expresan con la media \pm DE. p75 CD34⁺/KDR⁺ =0,05; p75 CD34⁺/ VE-cadherina⁺ =0,06; p75 CD14⁺/endogлина⁺ = 3,78. GIM-c: grosor íntima-media.

4.2.2. Asociación entre los niveles de EPCs, el GIM-c y el TAR.

Puesto que el TAR parecía estar influenciando tanto los niveles de EPCs como el GIM-c, nuestro siguiente objetivo fue estudiar la asociación entre los niveles de EPCs, el GIM-c y el uso prolongado de los principales grupos farmacológicos. En nuestros pacientes con VIH, 172 pacientes (95,6%) tenían prescrito ITIANs, 138 (76,6%) ITINANs y 114 (63,3%) IPs, de los cuales 129 pacientes (75%) llevaban mas de 5 años tomando ITIANs, 33 (23,9%) ITINANs y 67 (58,8%) IPs.

Como se observa en la figura 20, el tratamiento prolongado con cualquiera de los tres grupos farmacológicos se asoció con niveles disminuidos de células CD34⁺/KDR⁺ y mayor GIM-c, aunque solo con los ITIANs y los IPs estas diferencias alcanzaron significación estadística (figura 20). Por el contrario, no encontramos ninguna asociación entre la concentración de células CD34⁺/VE-cadherina⁺ y CD14⁺/endoglina⁺, el GIM-c y el tratamiento con ITIANs, ITINANs y/o IPs.

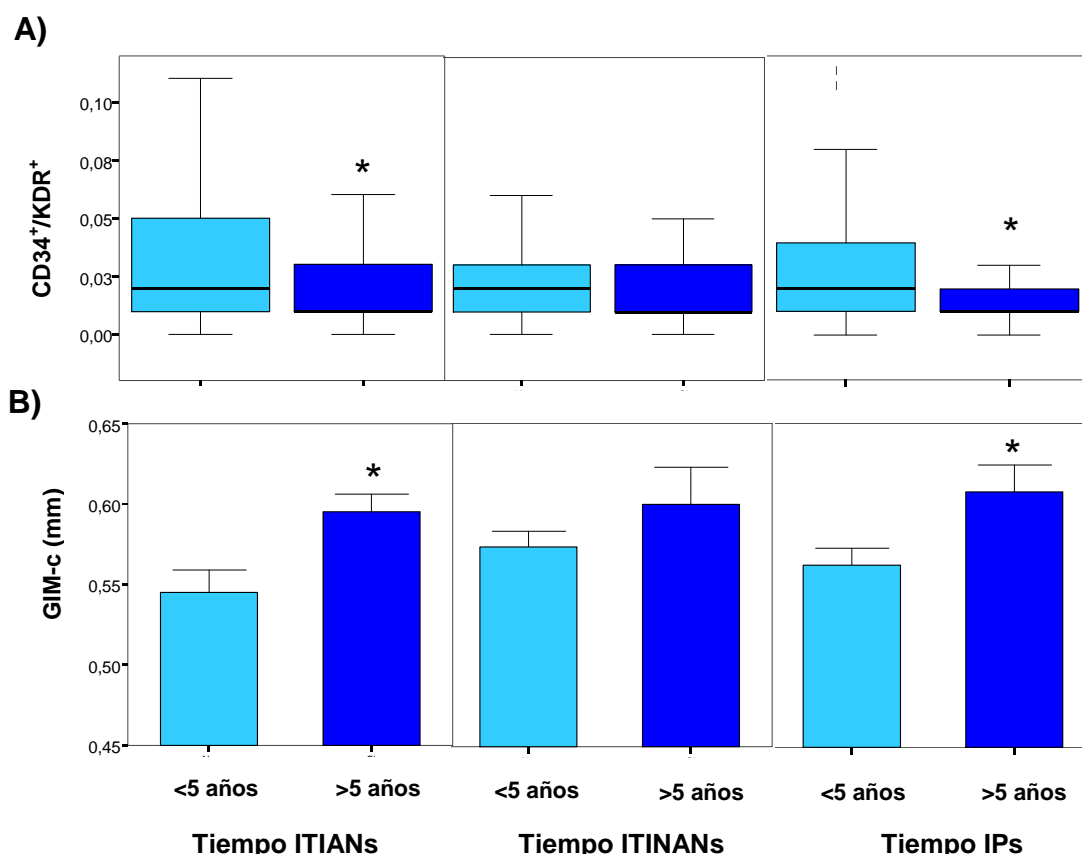


Figura 20. Niveles de células CD34⁺/KDR⁺ (A) y GIM-c (B) en relación al tiempo de exposición a ITIANs, ITINANs, y/o IPs. Los datos se expresan mediante diagrama de cajas o como la media ± DE. *p<0,05 vs pacientes con menos tiempo de tratamiento. GIM-c: grosor íntima-media carotideo; ITIANs: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; ITINANs: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IPs: inhibidores de proteasas.

En un análisis de regresión multivariante en el que se introdujeron como variables los factores de riesgo cardiovascular y el estatus de VIH, el tiempo de exposición a IPs durante más de 5 años se mantuvo significativamente asociado con la disminución de los niveles de células CD34⁺/KDR⁺.

4.3. Estudio de las HDL de pacientes VIH.

Aunque la eliminación del exceso de colesterol de los vasos es una de las principales funciones ateroprotectoras de la HDL, en los últimos años se han descrito otras funciones de la HDL que también podrían contribuir a este papel beneficioso de la lipoproteína. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue estudiar la capacidad anti-inflamatoria y antioxidante de las partículas HDL, así como su composición, de los pacientes con VIH.

4.3.1. Estudio de las distintas subclases de HDL en los pacientes VIH.

Las HDLp son moléculas heterogéneas con múltiples subclases que se diferencian por su carga, densidad, tamaño, composición y forma. En este trabajo, hemos medido la concentración de las distintas HDLp mediante RMN, técnica que, a partir de medidas de amplitud de la señal que emiten los grupos metilo, identifica cada una de las subclases de HDL según su tamaño.

Como se observa en la figura 21, los pacientes naïve al tratamiento presentaron una concentración menor de todas las subclases de HDLp en comparación con los sujetos control. En los pacientes VIH con TAR se observó una recuperación de las concentraciones de HDLp pequeñas y medianas pero no de las HDLp grandes, que se mantuvieron significativamente disminuidas con respecto a los sujetos control, y similares a las de los pacientes naïve al tratamiento.

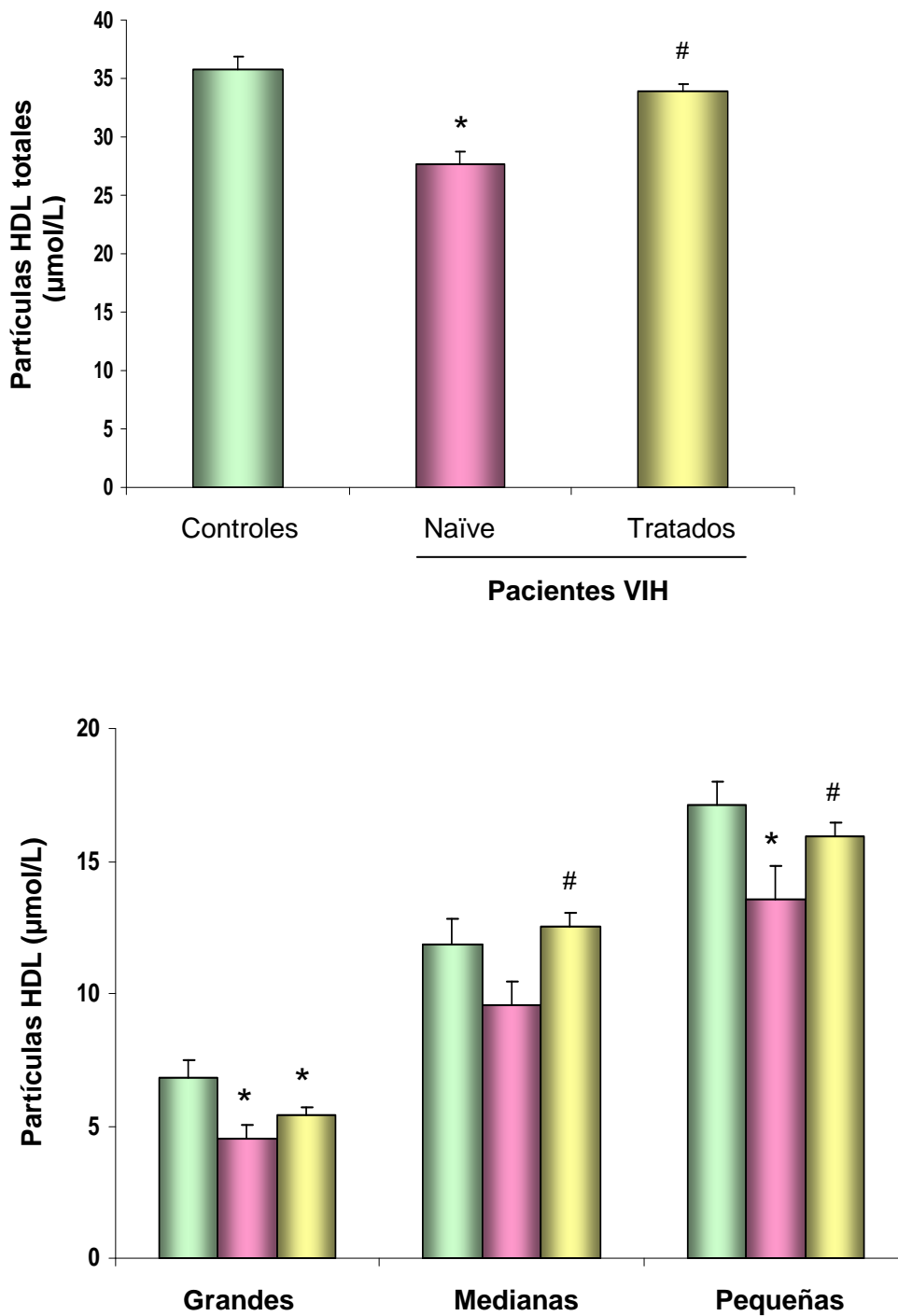


Figura 21. Concentración plasmática de partículas de HDL totales (A), grandes, medianas y pequeñas (B), cuantificadas mediante resonancia magnética nuclear, de los sujetos control y de los pacientes con VIH. *p<0,05 vs controles. #p<0,05 vs pacientes naïve al tratamiento.

No encontramos asociación entre la cantidad de HDLp de los pacientes con VIH y los FRCV tradicionales, o con el estatus de la infección VIH. Sin embargo, entre los pacientes en TAR, observamos una relación positiva entre los niveles de HDLp grandes y el tiempo de exposición a ITINANs ($r=0,197$, $p<0,05$).

La concentración de HDLp grandes se asoció inversamente con el GIM-c (figura 22) de los pacientes, y esta asociación se mantuvo significativa en un análisis multivariable introduciendo en el modelo las variables relacionadas con FRCV (edad, HTA, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia) y con la infección por VIH ($B=-0,011$, $p=0,006$).

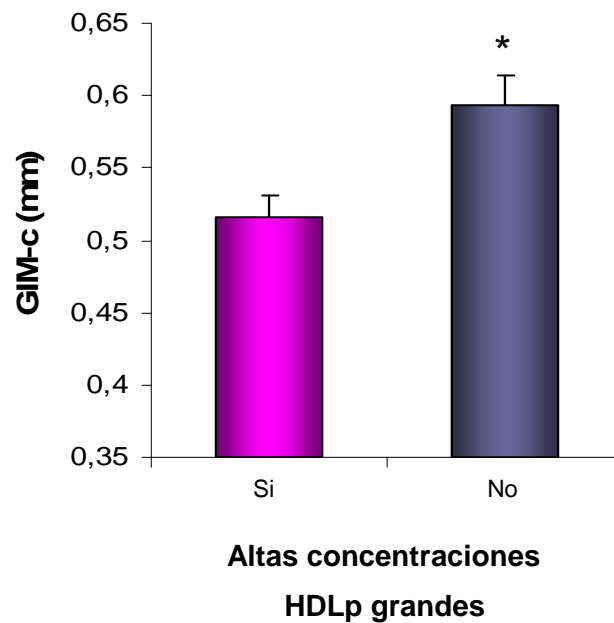


Figura 22. Valores de GIM-c en los pacientes con VIH en relación a la concentración de HDLp grandes. Tanto en los pacientes VIH-naïve al tratamiento como en los pacientes VIH en TAR las concentración de HDLp grandes por encima del tercer tercil ($5.9 \mu\text{mol/L}$) fueron consideradas como altas concentraciones de HDLp grandes. Los datos se expresan como la media \pm DE. * $p<0.05$ vs altas concentraciones de HDLp grandes.

4.3.2. Estudio de la funcionalidad de las HDL en los pacientes VIH.

Para analizar la funcionalidad de las HDL aisladas de los pacientes con VIH, evaluamos su capacidad anti-inflamatoria y anti-oxidante en comparación con la de las HDL aisladas de sujetos sin infección mediante estudios *in vitro*. Debido a la complejidad de las técnicas, estos experimentos, se realizaron en 111 pacientes y 12 controles elegidos al azar. Sus características, que fueron similares a las de nuestra muestra total, se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Características clínicas de los sujetos.

| | Controles | | Pacientes VIH | |
|---------------------------------|-------------|---------------|-----------------|----|
| | (N=12) | Naïve (N=23) | Tratados (N=76) | |
| Edad, años | 35 ± 6 | 39 ± 12 | 45 ± 10 | *# |
| Hombres, n (%) | 2 (17) | 20 (87) * | 64 (84) * | |
| IMC, kg/m ² | 23,8 ± 2,4 | 22,2 ± 2,4 | 23,6 ± 2,5 | |
| PAS, mmHg | 115 ± 7 | 114 ± 9 | 114 ± 19 | |
| Glucosa, mg/dL | 92 ± 12 | 93 ± 9 | 96 ± 10 | |
| Colesterol total, mg/dL | 177 ± 13 | 153 ± 21 | 192 ± 26 # | |
| cHDL, mg/dL | 51 ± 10 | 46 ± 13 | 52 ± 13 | |
| cLDL, mg/dL | 112 ± 20 | 87 ± 24 | 116 ± 24 | |
| Triglicéridos, mg/dL | 89 (56-118) | 101 (76-129) | 135 (83-179) | *# |
| Carga viral indetectable, n (%) | ---- | 2 (8) | 57 (84) # | |
| Linfocitos CD4, cel/mL | ---- | 521 (346-671) | 538 (267-670) | |
| Tiempo diagnóstico VIH, años | ---- | 4 (1-6) | 10 (4-14) | |
| Tiempo con ITIANs, años | ---- | ---- | 14 (7-21) | |
| Tiempo con ITINANs, años | ---- | ---- | 4 (1-7) | |
| Tiempo con IPs, años | ---- | ---- | 4 (0-6) | |

Los datos se expresan como la media ± DE o la mediana (rango intercuartilo). *p<0,05 vs grupo control; #p<0,05 vs grupo naïve. IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; ITIANs: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; ITINANs: Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IPs: inhibidores de proteasas.

4.3.2.1. Actividad anti-inflamatoria de las HDL.

4.3.2.1.1. Efecto de la HDL sobre la quimiotaxis de monocitos humanos.

La capacidad anti-inflamatoria de la HDL de los pacientes se cuantificó evaluando su capacidad para inhibir la quimiotaxis de las células THP-1 utilizando MCP-1 como inductor. Para ello, las células se incubaron con HDL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aisladas de los pacientes VIH y de los controles durante 30 minutos y después se dejaron migrar durante 2 h. En la figura 23 se muestra como la HDL de los pacientes VIH, principalmente la de los pacientes naïve al tratamiento, permitió una mayor migración de los monocitos que la HDL de los sujetos sin infección, lo que sugiere una menor capacidad anti-inflamatoria.

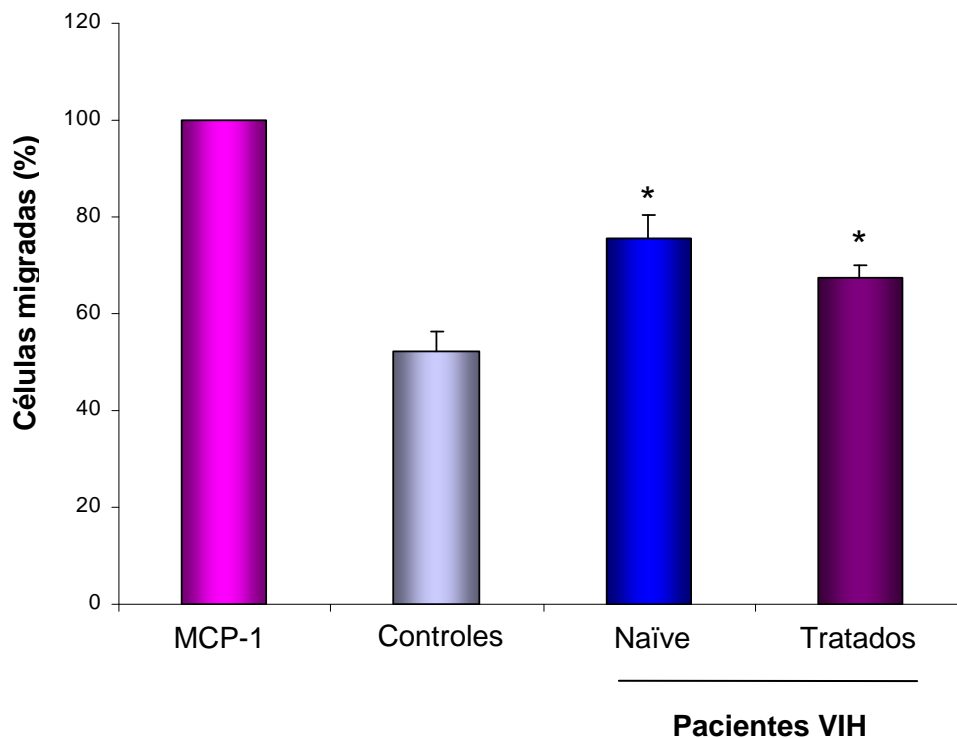


Figura 23. Figura. Efecto de las HDL de pacientes con VIH, con y sin TAR, y de sujetos controles sobre la migración de monocitos humanos inducida por MCP-1 (100 ng/mL). Los resultados se expresan como la media \pm DE. * $p < 0,05$ vs controles.

4.3.2.1.2. Efecto de las HDL sobre la expresión de moléculas de adhesión.

Puesto que la expresión de moléculas de adhesión es un paso fundamental para que los monocitos puedan migrar desde el torrente sanguíneo hacia el espacio subendotelial, nuestro siguiente objetivo fue cuantificar, mediante citometría de flujo, la expresión de CD11b, presente exclusivamente en los monocitos, y de ICAM-1, expresado tanto en células endoteliales como monocitos, en presencia o ausencia de HDL aisladas de pacientes con VIH y de los sujetos control.

La preincubación de los monocitos con HDL aisladas de pacientes VIH sin TAR, aunque no con las de pacientes con TAR, indujo un aumento significativo de la expresión de CD11b inducida por TNF- α con respecto a la inducida en presencia de HDL aisladas de sujetos control. Por el contrario, no observamos diferencias significativas en la expresión de ICAM-1 en los monocitos preincubados con las HDL aisladas de los pacientes o de los sujetos control (tabla 6).

Tabla 6. Efecto de la HDL aislada del suero de los sujetos de estudio sobre la expresión de moléculas de adhesión en monocitos humanos.

| | Células CD11b positivas (%) | Células ICAM-1 positivas (%) |
|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| TNF-α | 100 | 100 |
| CONTROLES | 93 \pm 18 | 77 \pm 14 |
| VIH-NAIVE | 124 \pm 10 * | 88 \pm 16 |
| VIH-TRATADOS | 96 \pm 8 # | 80 \pm 14 |

Los datos se expresan como la media \pm DE. *p<0,05 vs control. #p<0,05 vs naïve al tratamiento.

4.3.2.2. Actividad antioxidante de las HDL.

4.3.2.2.1. Capacidad de las HDL de inhibir la oxidación de la LDL "in vitro".

En primer lugar, medimos la capacidad de las HDL para inhibir la oxidación de la LDL inducida *in vitro*. Para ello, tomamos LDL humana comercial y se oxidó con sulfato de cobre en presencia o ausencia de HDL aisladas de pacientes VIH y de sujetos control. El grado de oxidación de la LDL se calculó cuantificando la cantidad de MDA generada. Como se muestra en la figura 24, la cantidad de MDA generada fue significativamente mayor cuando la reacción se realizó en presencia de HDL aisladas de pacientes con VIH, sobretodo de pacientes con TAR, que cuando las HDL provenían de sujetos control, lo que demuestra una menor capacidad anti-oxidante.

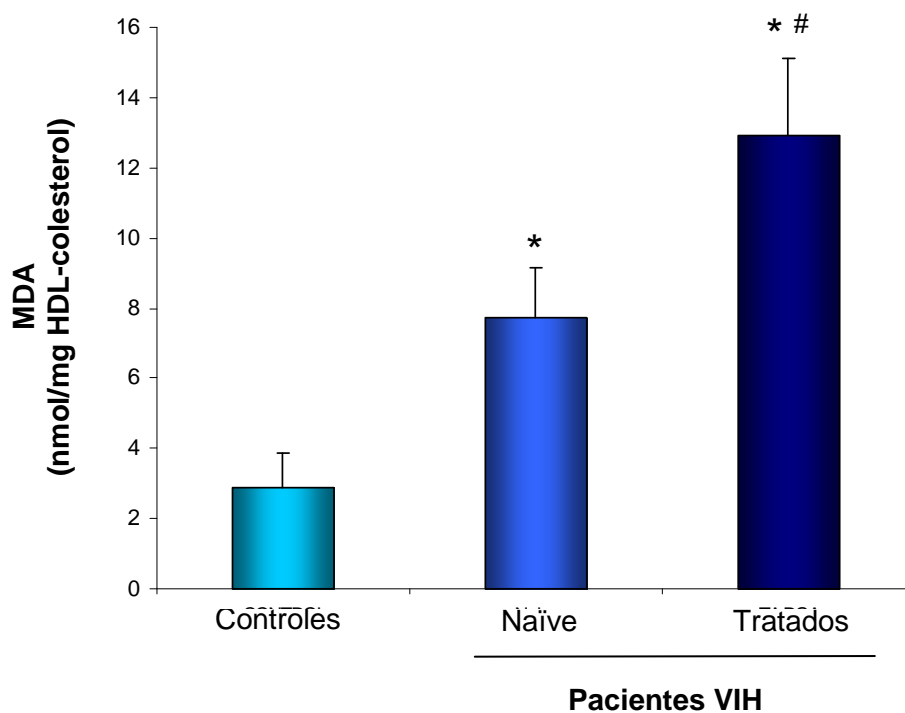


Figura 24. Oxidación de LDL inducida por sulfato de cobre *in vitro* en presencia de HDL aisladas de pacientes con VIH, con y sin tratamiento antirretroviral, y de sujetos controles. Los resultados representan la media \pm DE. * $p < 0,05$ vs controles. # $p < 0,05$ vs naïve al tratamiento. MDA: malondialdehído.

4.3.2.2.2. Cuantificación de la LDLox en el plasma.

A continuación cuantificamos la concentración de la LDL oxidada aisladas del plasma de los pacientes VIH en comparación con las aisladas de los sujetos controles, lo que proporciona de manera indirecta una medida de la capacidad antioxidante de la HDL in vivo. Como esperábamos, los pacientes VIH, principalmente los que siguen tratamiento antirretroviral, presentaron niveles plasmáticos significativamente mayores de LDLox que los sujetos control.

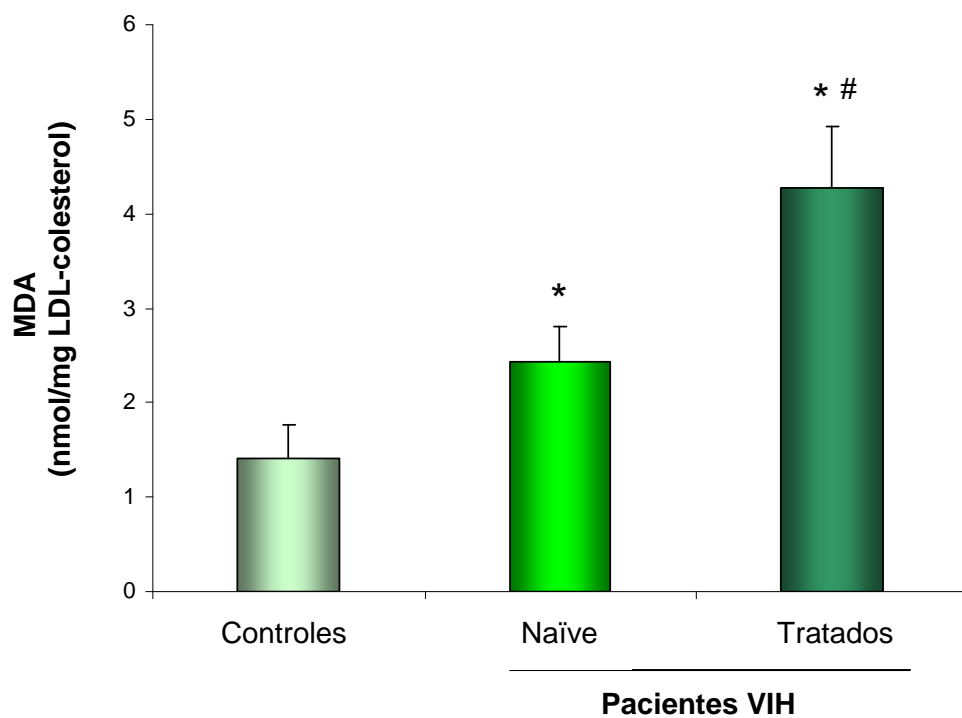


Figura 25. Niveles de LDLox en el plasma de los sujetos control y de los pacientes VIH con y sin TAR. Los resultados representan la media \pm DE. * $p < 0,05$ vs controles. # $p < 0,05$ vs naïve al tratamiento. MDA: malondialdehído.

4.3.2.3. Análisis de la composición de las HDL.

Puesto que se ha demostrado que muchas de las funciones de la HDL dependen de su composición en proteínas y/o lípidos, nuestro siguiente objetivo fue determinar la concentración de las principales proteínas que forman parte de la HDL en los pacientes VIH, sin y con tratamiento antirretroviral, en comparación con los sujetos control.

4.3.2.3.1. Apolipoproteína A-I.

La **ApoA-I** es la principal proteína estructural de la HDL y está implicada en el proceso de formación y maduración de la lipoproteína, entre otras funciones. En comparación con la HDL aislada de los sujetos control, las HDL de los pacientes con VIH, sin y con TAR, muestran una disminución significativa de la cantidad de ApoA-I. Esta reducción es mayor en las HDL de los pacientes naïve al tratamiento (figura 26).

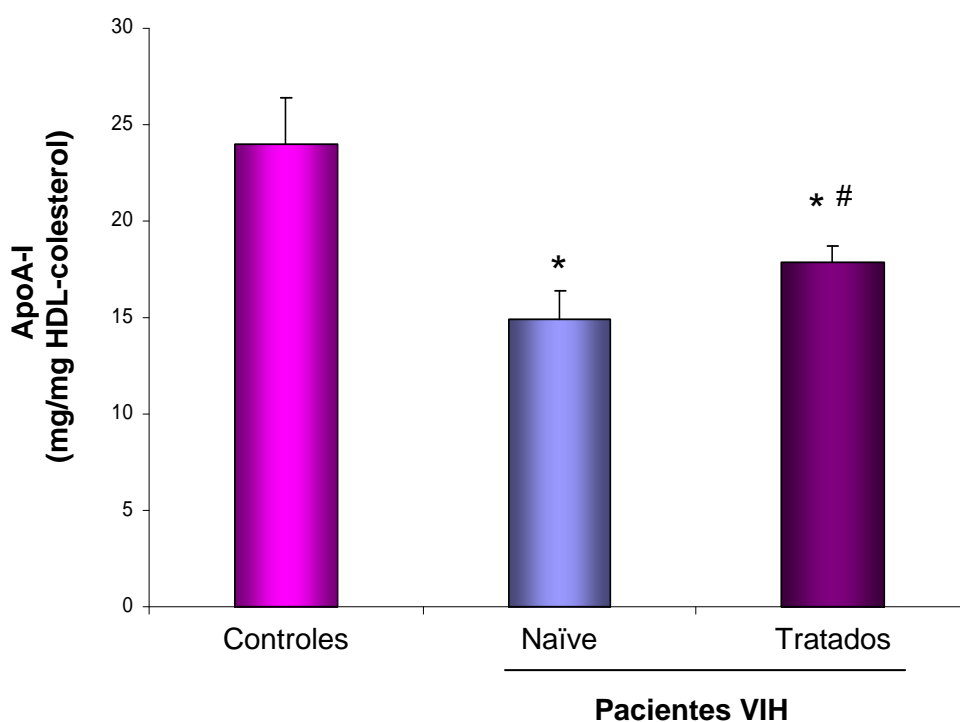


Figura 26. Niveles de ApoA-I en las HDL aisladas de los pacientes VIH, sin y con TAR y sujetos controles. Los resultados representan la media \pm DE. * $p < 0,05$ vs controles. # $p < 0,05$ vs naïve al tratamiento.

4.3.2.3.2. Lecitin:colesterol acil transferasa.

La enzima LCAT, una de las principales enzimas de las HDL, está implicada en el transporte reverso de colesterol. Además, junto con la PON-1 y la PAF-AH, parece ser responsable de la función anti-inflamatoria y antioxidante de la HDL [150].

Como se muestra en la figura 27, las HDL de los pacientes con VIH naïve al tratamiento presentaron una disminución en la concentración de la LCAT con respecto a los sujetos controles, mientras que en los pacientes con TAR se restablecieron los niveles.

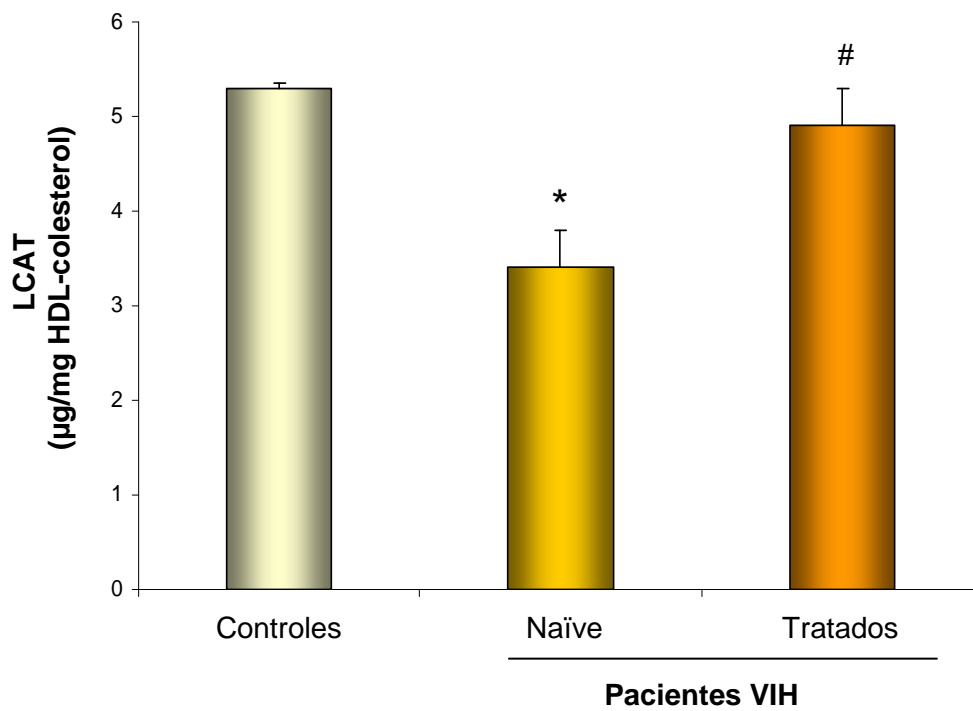


Figura 27. Niveles de LCAT en las HDL aisladas de los pacientes VIH, sin y con TAR, y de los sujetos control. Los resultados representan la media \pm DE. *p<0,05 vs controles. #p<0,05 vs naïve al tratamiento

4.3.2.3.3. Amiloide sérico A.

El SAA es una proteína reactante de fase aguda que se caracteriza por incorporarse a las HDL durante los procesos inflamatorios. Como se observa en la figura 28, la cantidad de SAA unida a las HDL de los pacientes con VIH fue mayor que la unida a las HDL de los sujetos control. Este aumento tendió a ser mayor en los pacientes naïve al tratamiento que en los pacientes VIH con TAR.

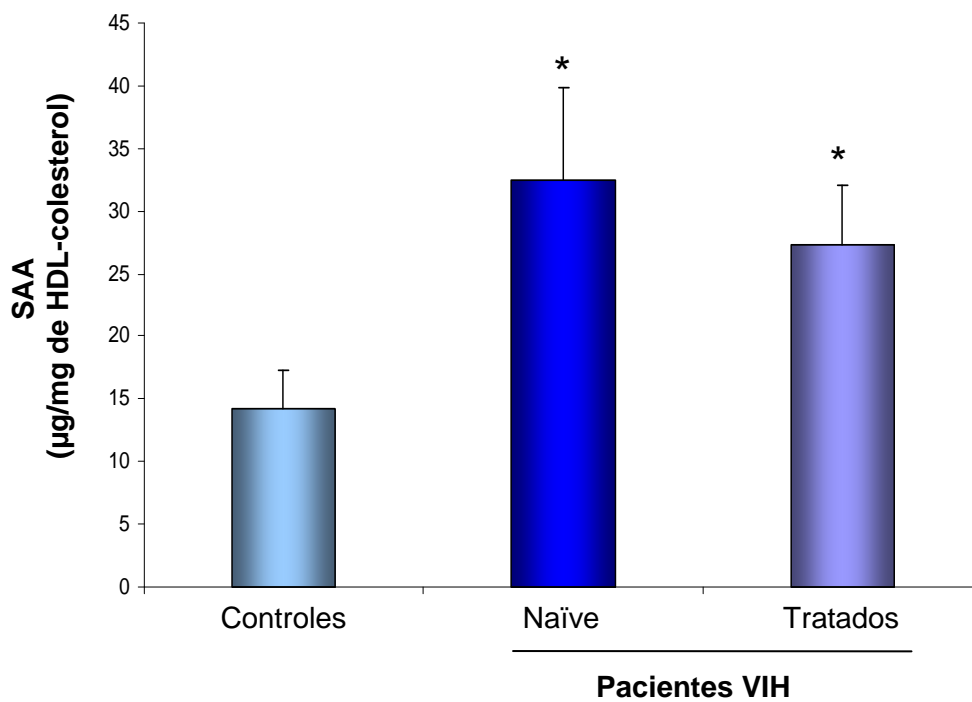


Figura 28. Niveles de SAA en las HDL aisladas de los pacientes VIH, sin y con TAR, y de los sujetos control. Los resultados representan la media \pm DE. * $P < 0,05$ vs controles.

4.3.2.3.4. Lipoproteína asociada a la fosfolipasa A₂.

Se ha demostrado que alteraciones, tanto en la cantidad como en la actividad, de la Lp-PLA₂ asociada a HDL contribuyen a una deficiencia en la actividad antioxidante de la lipoproteína [149].

En los pacientes VIH naïve al tratamiento, la cantidad de Lp-PLA₂ asociada a HDL era significativamente menor que en los sujetos control, mientras que en los pacientes con VIH en TAR se encontró significativamente aumentada (figura 29).

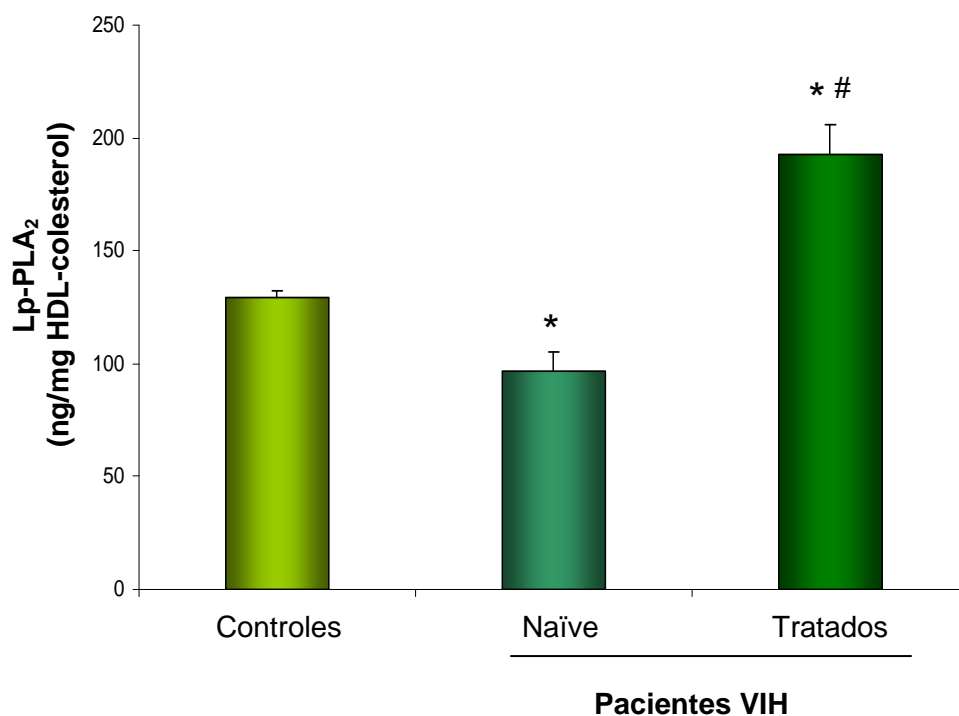


Figura 29. Cantidad de Lp-PLA₂ en las HDL aisladas de los pacientes VIH, sin y con TAR, y de los sujetos control. Los resultados representan la media \pm DE. * $p < 0,05$ vs controles. # $p < 0,05$ vs naïve al tratamiento.

Resultados similares observamos al cuantificar la actividad enzimática de la Lp-PLA₂ asociada a HDL. Como se muestra en la figura 30, solamente en las HDL aisladas de los pacientes VIH en TAR existía un aumento de la actividad Lp-PLA₂, aunque no llegó a alcanzar significación estadística.

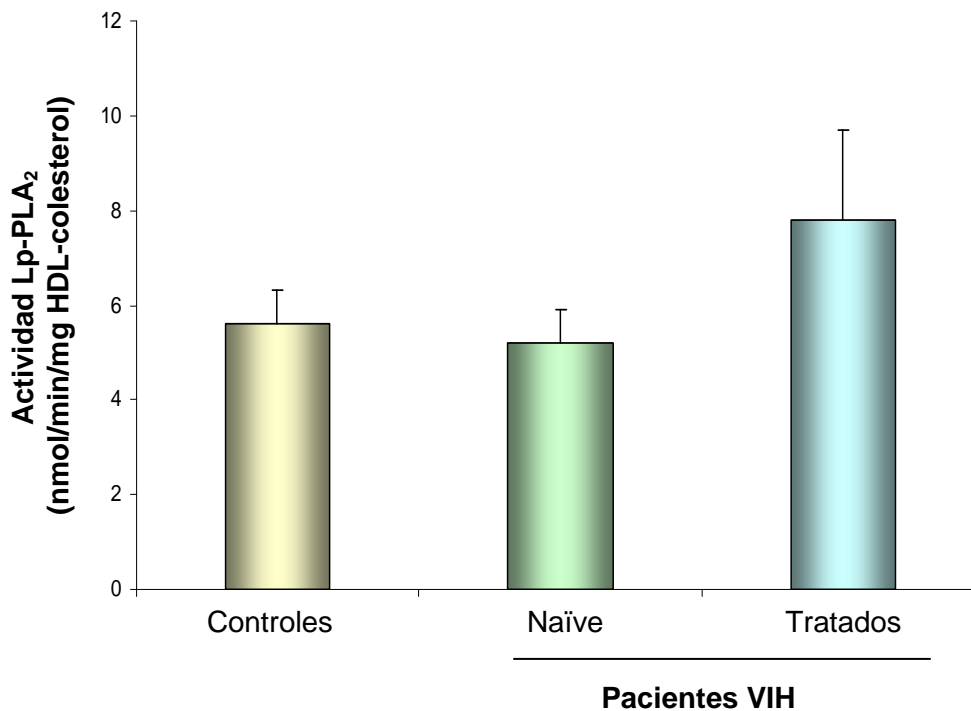


Figura 30. Actividad de la Lp-PLA₂ asociada a HDL aislada de los pacientes VIH, sin y con TAR, y de los sujetos control. Los resultados representan la media \pm DE.

4.4. Asociación entre la función de la HDL y la presencia de arteriosclerosis subclínica.

Se consideraron pacientes con HDL disfuncional a aquellos que presentaron valores de quimiotaxis u oxidación de la LDL plasmática mayores del p50 de la muestra (67,6 % células migradas y 2,4 nmol MDA/mg LDL-colesterol, respectivamente). De acuerdo con este criterio, 65 sujetos, cuyas características clínicas se resumen en la tabla 7, presentaron HDL disfuncionales. No se encontraron diferencias significativas en edad, TAS, IMC, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL entre los pacientes con y sin HDL funcional, pero sí en los valores de glucosa aunque se mantuvieron siempre dentro de valores normales en ambos grupos.

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes con VIH en relación a la funcionalidad de sus HDL

| | HDL funcional (N=35) | HDL disfuncional (N=65) |
|------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Edad, años | 44 ± 11 | 43 ± 10 |
| PAS,mmHg | 113 ± 17 | 115 ± 18 |
| IMC, kg/m² | 23,7 ± 2,5 | 23,1 ± 2,6 |
| Glucosa, mg/dL | 98 ± 9 | 93 ± 10 * |
| Colesterol, mg/dL | 184 ± 21 | 180 ± 26 |
| cHDL, mg/dL | 51 ± 13 | 50 ± 13 |
| cLDL, mg/dL | 111 ± 24 | 106 ± 24 |
| Triglicéridos, mg/dL | 142 (83-183) | 118 (83-141) |

Los datos se expresan como la media ± DE o la mediana (rango intercuartilo). * p<0,05. PAS: presión arterial sistólica; IMC: índice de masa corporal.

En relación a las variables asociadas con la infección del virus, tampoco se encontraron diferencias entre los pacientes con HDL funcionales o disfuncionales (tabla 8). Hay que destacar que casi el 68% de los pacientes con HDL disfuncionales se encontraban recibiendo TAR.

Tabla 8. Variables clínicas relacionadas con la infección por el VIH de los pacientes en relación a la funcionalidad de sus HDL.

| | HDL funcional (N=35) | HDL disfuncional (N=65) |
|---------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| en TAR (%) | 30 (85,7) | 44 (67,7) * |
| Carga viral indetectable, n (%) | 20 (57,1) | 38 (58,5) |
| Linfocitos CD4>250, n (%) | 27 (77,1) | 53 (81,5) |
| Tiempo diagnóstico VIH, años | 8 (2-11) | 8 (2-13) |
| Tiempo con ITIANs, años | 11 (2-20) | 13 (4-21) |
| Tiempo con ITINANs, años | 3 (1-6) | 4(0-7) |
| Tiempo con IPs, años | 3 (0-9) | 3 (0-6) |

Los datos se expresan como la mediana (rango intercuartilo). Se consideró carga viral indetectable <20 copias/mL. * p<0,05. TAR: tratamiento antirretroviral; ITIANs: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; ITINANs: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IPs: inhibidores de proteasas.

Respecto a la composición de las partículas, las HDL consideradas disfuncionales presentaban niveles significativamente más bajos de ApoA-I y LCAT, proteínas relacionadas con el transporte reverso de colesterol y con su actividad antioxidante y anti-inflamatoria (tabla 9). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas respecto a la concentración de otras proteínas como Lp-PLA₂ y SAA entre HDL funcionales y disfuncionales.

Tabla 9. Concentración de ApoA-I, LCAT, Lp-PLA2 y SAA en las HDL aisladas de los pacientes con VIH en relación a su funcionalidad.

| | HDL funcional (N=35) | HDL disfuncional (N=65) |
|---|-------------------------|----------------------------|
| Apo A-I, mg/mg HDL-colesterol | 20,2 ± 1,0 | 14,2 ± 0,8 ** |
| LCAT, µg/mg HDL-colesterol | 5,5 ± 0,5 | 3,7 ± 0,3 * |
| LpPLA ₂ , ng/mg HDL-colesterol | 163 ± 10 | 169 ± 18 |
| LpPLA ₂ actividad, nmol/min/mg HDL-colesterol | 5,7 ± 0,7 | 6,5 ± 1,2 |
| SAA, µg/mg HDL-colesterol | 32,9 ± 0,6 | 23,7 ± 4,9 |

Los datos se expresan como la media ± DE. * p<0,05. **p<0,001. Apo A-I: apoproteína A-I; LCAT: lecitin-colesterol acil transferasa; Lp-PLA2: lipoproteína asociada a la fosfolipasa A2.

4.4.4. Asociación entre HDL disfuncional y GIM-c.

A pesar de no existir diferencias significativas en las variables asociadas al riesgo cardiovascular o a la infección por VIH entre los pacientes con VIH con y sin HDL disfuncionales, los pacientes con HDL disfuncionales presentaron valores significativamente más elevados de GIM-c que los pacientes con HDL funcionales (figura 31).

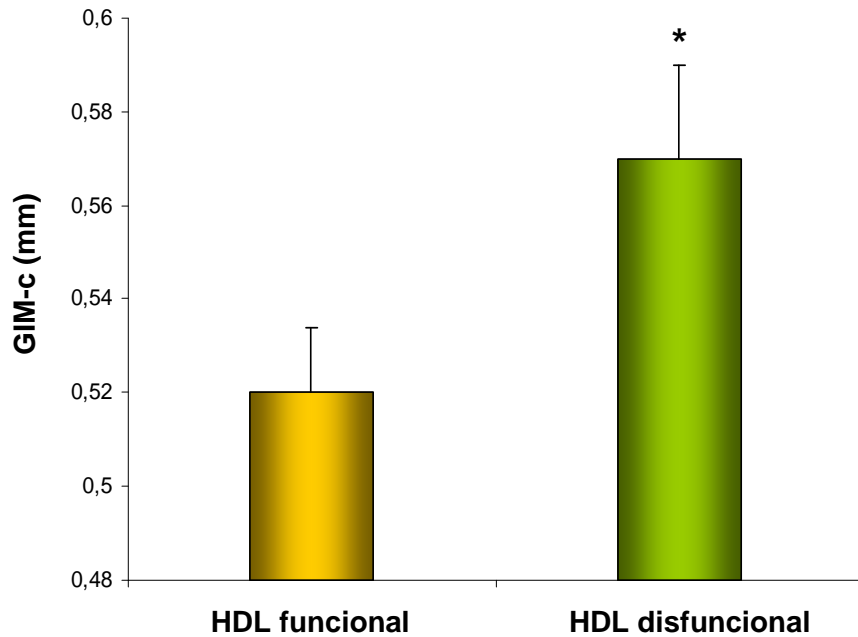


Figura 31. Valores de GIM-c en los pacientes con VIH en función de la presencia o no de HDL disfuncional. $p=0,05$ vs HDL funcional.

4.4.5. Asociación entre HDL disfuncional y EPCs.

Puesto que recientemente se ha propuesto que las HDL podrían ejercer su efecto beneficioso sobre el endotelio vascular a través de la movilización de las EPCs, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si existía alguna asociación entre los niveles circulantes de EPCs y la funcionalidad de las HDL. Para ello, los pacientes se distribuyeron en pacientes con niveles de EPCs CD34+/KDR+ y CD34+/VE-cadherina+ bajos ($p < 75$; CD34+/KDR+ = 0,06%; CD34+/VE-cadherina+ = 0,1%) o altos ($p \geq 75$). Como se observa en la figura 32, una gran mayoría de pacientes con HDL disfuncionales tenían bajos niveles circulantes de EPCs CD34+/KDR+ y CD34+/VE-cadherina+. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas respecto a los niveles de EPCs CD14+/endogлина+ con respecto a la funcionalidad de las HDL.

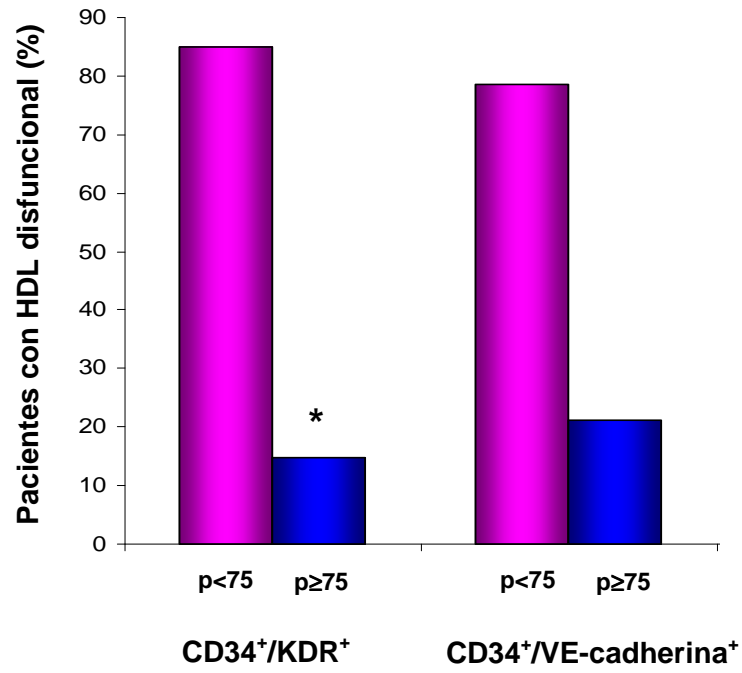


Figura 32. Porcentaje de pacientes con HDL disfuncional en función de sus niveles de EPCs CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/VE-cadherina⁺. * p < 0,05.

5. DISCUSIÓN

5.1. Relación entre los niveles de EPCs y la arteriosclerosis subclínica en los pacientes con infección por VIH.

Actualmente, las EPCs son consideradas un elemento clave en la protección y regeneración del endotelio, además de importantes predictores de eventos cardiovasculares [151]. En modelos animales se ha demostrado que son capaces de revertir la disfunción endotelial y prevenir la arteriosclerosis [151]. En pacientes con FRCV, niveles bajos de EPCs circulantes se asocian con una menor supervivencia de los pacientes [151].

Nuestros datos demuestran que los pacientes infectados por VIH presentan una disminución en el número de EPCs circulantes (CD34⁺/KDR⁺, CD34⁺/VE-cadherina⁺ y CD14⁺/endoglina⁺) y que el TAR sólo restituyó los valores de células CD14⁺/endoglina⁺. Estas alteraciones se mantuvieron después de controlar los FRCV y los parámetros relacionados con la propia infección del virus. Nuestros resultados confirman estudios realizados anteriormente usando la misma metodología de trabajo, que ponen de manifiesto que la infección por VIH no controlada se asocia con una reducción de los niveles de CD34⁺/KDR⁺ en comparación con los sujetos no infectados [152; 153]. Además, hemos estudiado un buen número de pacientes con TAR y hemos cuantificado otros fenotipos de EPCs, demostrando que los niveles de CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/VE-cadherina⁺ persisten disminuidos en pacientes con la infección controlada.

A día de hoy, las células CD34⁺/KDR⁺ son el único subtipo de EPC que se asocia claramente con el riesgo cardiovascular. Aunque con algunas discrepancias, en la población general, la mayoría de los trabajos han identificado una asociación entre los FRCV y niveles bajos de células CD34⁺/KDR⁺ [54; 66; 154]. Sin embargo, en nuestra población de pacientes VIH, los FRCV tradicionales, como tabaquismo, hipertensión, hiperlipidemia, no se asociaron a niveles bajos de EPCs. Aunque desconocemos los mecanismos responsables, es posible que la infección por el VIH esté enmascarando los efectos de los FRCV en la reducción del número de EPCs en nuestra cohorte de pacientes infectados por VIH. Muchos mecanismos tales como los niveles de estrés oxidativo, óxido nítrico o citoquinas (por ejemplo, SDF-1, VEGF y CD40L), que se han relacionado directamente con la movilización o la vida media de las EPCs, pueden estar influenciados tanto por FRCV como por la infección de VIH *per se* [55; 65; 155; 156]. Al igual que los principales FRCV, la infección por VIH se asocia con una mayor producción de radicales libres, estrés oxidativo crónico y disfunción endotelial que se ha atribuido a la

disminución en la expresión de la NO sintasa endotelial (eNOS) [157]. Además, estudios experimentales han demostrado que ciertos TAR pueden regular negativamente la expresión de eNOS, teniendo un impacto directo sobre la disfunción endotelial [158]. Tras la liberación de las EPCs por la médula ósea, éstas alcanzan el tejido dañado siguiendo un gradiente de citoquinas, principalmente SDF-1, CD40L y VEGF, que han demostrado participar en el desarrollo y progresión de la placa de arteriosclerosis [54; 63]. En la población general, niveles plasmáticos elevados de SDF-1 o CD40L, se asocian inversamente no sólo con el número de EPCs, sino también su capacidad para formar colonias en cultivo [58; 156]. En pacientes con VIH, se ha demostrado una elevación de estos marcadores inflamatorios [155; 159; 160].

Aunque algo controvertido, varios estudios han demostrado la presencia de SMPCs con potencial para diferenciarse en células vasculares en lesiones arterioscleróticas [56]. Las células CD14⁺/endogлина⁺ derivadas de células mononucleares periféricas del torrente sanguíneo se han identificado como una fuente importante de SMPCs [57]. Los pacientes VIH con TAR mostraron un incremento en los niveles de células CD14⁺/endogлина⁺ con respecto a los pacientes sin tratamiento previo, sorprendentemente similares a los niveles presentados por los pacientes no infectados. El papel exacto de las SMPCs no está demasiado claro. Hay algunas evidencias que demuestran que estas células pueden contribuir en el desarrollo de la enfermedad vascular. Los pacientes con enfermedad arterial coronaria muestran un aumento significativo de los niveles de células CD14⁺/endogлина⁺ en comparación con pacientes sin enfermedad arterial coronaria [57], lo que sugeriría que la movilización de estas células podrían promover la enfermedad vascular. Sin embargo, en un modelo experimental, la administración continuada de SMPCs limitó el desarrollo de la lesión arteriosclerótica y estabilizó la placa [161]. En pacientes con síndrome coronario agudo, la deficiencia en SMPCs se ha asociado con vulnerabilidad de la placa [56]. Por lo tanto, serán necesarios estudios longitudinales para poder establecer cuál puede ser el papel de las células CD14⁺/endogлина⁺ en el proceso de la arteriosclerosis asociado a pacientes con VIH.

Aunque los pacientes con VIH presentan un mayor riesgo relativo de eventos cardiovasculares, en números absolutos son escasos [162], dado que se trata de una población de mediana edad. Por ello, para evaluar el riesgo de ECV en estos pacientes, la mayoría de estudios realizados utilizan marcadores subrogados como la medición del GIM-c que hemos utilizado en esta tesis. El incremento del GIM-c es un predictor independiente de eventos cardiovasculares [163; 164]. En los pacientes con VIH, tanto la

infección del virus *per se* como el TAR son factores de riesgo independientes para presentar un GIM-c incrementado [163], aunque su relación con el desarrollo de eventos cardiovasculares no ha sido puesta de manifiesto aún. En población general, las células CD34⁺/KDR⁺ se asocian con un aumento del GIM-c. En consecuencia, estudios previos han demostrado que sus niveles son importantes predictores de eventos cardiovasculares no solo en pacientes con distintos FRCV, si no, incluso en sujetos sanos [65; 66; 154; 165]. En nuestro trabajo, los pacientes con niveles más bajos de células CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/VE-cadherina⁺, o más altos de CD14⁺/endoglina⁺, presentaron un mayor GIM-c, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Una posible explicación podría ser el diferente impacto de los FRCV tradicionales y los parámetros propios de la infección por VIH sobre los niveles de EPCs y GIM-c. En nuestro estudio, la edad, los niveles de glucosa y el tiempo acumulado de tratamiento con ITIANs o IPs fueron los predictores más importantes del incremento del GIM-c. Sin embargo, el predictor más potente de los niveles de EPCs fue el tratamiento con TAR, sin que hubiera una influencia clara de los principales grupos farmacológicos. De hecho, al analizar la relación entre los niveles de EPCs, el GIM-c y la TAR, con niveles disminuidos de células CD34⁺/KDR⁺ sólo se asociaron con un mayor GIM-c en los pacientes que llevaban más tiempo en tratamiento con ITIANs y/o IPs. Aunque nuestro estudio encontró una modesta asociación entre niveles bajos de EPCs e incremento del GIM-c, no podemos descartar el papel de las EPCs como factores de riesgo de arteriosclerosis en pacientes con VIH, ya que estudios previos han identificado que una diferencia del 5% en el GIM-c corresponde a un riesgo relativo de aparición de un evento cardiovascular futuro (IAM o accidente cerebrovascular) de 1,04-1,14 [162].

Hasta el momento, existen dos abordajes para aislar y/o identificar las EPCs; por un lado su cultivo a partir de una muestra de sangre, y por otro, su identificación mediante citometría de flujo basándose en la expresión de marcadores en la superficie celular. El cultivo de las EPCs permite expandirlas para obtener una mayor cantidad y así poder estudiar su capacidad regenerativa, aunque no se sabe cómo las condiciones de cultivo afectan al fenotipo y a su funcionalidad. En esta tesis hemos identificado las EPCs mediante citometría de flujo, sin manipulaciones *ex vivo*. Sin embargo, esta es una de las principales limitaciones de nuestro trabajo, ya que actualmente no existe un consenso en la comunidad científica sobre qué marcadores identifican mejor a las EPCs, ya que los más comúnmente usados (CD34, KDR, CD14, α -SMA) también pueden ser expresados en células mesenquimales o hematopoyéticas [47; 166]. Además, tampoco existe un protocolo estandarizado de la técnica de citometría [47; 166]. Actualmente se han

identificado varios subtipos celulares, con diferentes fenotipos, que pueden contribuir a la homeostasis vascular, inicializando, facilitando y/o regulando la incorporación de las células al endotelio dañado [166]. Por ello, se ha propuesto usar el término EPCs para cualquier fenotipo celular que participe en el proceso de revascularización, indicando claramente el fenotipo y/o la funcionalidad al que se está haciendo referencia. En esta tesis hemos identificado células CD34+/KDR+, CD34+/VE-cadherina+ y CD14+/endogлина+ y, por tanto, los resultados obtenidos solo pueden aplicarse a estos subtipos celulares.

En este trabajo, no hemos identificado una clara asociación entre la TAR y los niveles de EPCs. Sin embargo, no era un objetivo nuestro el estudiar esta relación debido a las diferencias en los tiempos de exposición a los antirretrovirales y las numerosas combinaciones posibles entre fármacos de la misma o distinta familia. Por tanto, nuestros resultados, en este sentido, deben ser interpretados con cautela debido a la naturaleza transversal de nuestro estudio. Actualmente estamos realizando en nuestro laboratorio un estudio prospectivo que evalúa los niveles de EPCs en los pacientes con VIH a lo largo del tiempo, el cual nos permitirá valorar mejor el papel de la TAR.

En resumen, nuestros datos demuestran que la exposición al TAR es el principal predictor de los niveles de EPCs circulantes. Sin embargo, estos niveles sólo se asociaron parcialmente con un mayor GIM-c. Aunque son necesarios más estudios, es posible que estas células puedan servir como marcadores de riesgo cardiovascular, así como una posible línea de abordaje terapéutico en pacientes con VIH.

5.2. Distribución y funcionalidad de las partículas HDL de pacientes con VIH.

Otro de los mecanismos encargados de mantener la integridad de la pared del vaso, considerado hasta ahora como el principal mecanismo protector frente a la arteriosclerosis, es el transporte reverso de colesterol que realizan las HDL, un proceso por el cual las células eliminan el colesterol de su interior que les resulta tóxico [82].

La asociación inversa que existe entre la concentración plasmática de HDL y riesgo de desarrollar un evento cardiovascular es bien conocida [167]. Sin embargo, se han descrito pacientes con muy bajos niveles de HDL que no desarrollan la enfermedad, mientras otros, con niveles muy altos de HDL, presentan eventos coronarios prematuros [167]. La razón de esta aparente paradoja es el hecho de que las HDL poseen otras características antiaterogénicas. Efectivamente, en los últimos años se ha demostrado que la HDL también es capaz de ejercer actividades anti-inflamatorias, antitrombogénicas, antioxidantes de la LDL, entre otras, y que no dependen exclusivamente de la cantidad de HDL, sino de su estructura; y es que la HDL es una partícula muy heterogénea, dando lugar a distintos subtipos que se diferencian en su tamaño, carga y composición. Por ello, ha crecido el interés por el estudio de las subfracciones de HDL y su implicación en la evaluación del riesgo cardiovascular.

La infección por VIH se caracteriza por una disminución en los niveles plasmáticos de colesterol total, LDL y HDL, así como por un aumento de TG. En unos meses, tras el inicio con el TAR, los niveles de colesterol total y LDL se recuperan, llegando, en algunas ocasiones, incluso a sobrepasar los niveles anteriores al TAR. Por el contrario, en la mayoría de los pacientes los valores de HDL persisten bajos y solo aumentan con determinados fármacos antirretrovirales, por lo que los pacientes con VIH a menudo presentan una dislipemia aterogénica. Puesto que se ha sugerido que la HDL podría ser una importante diana terapéutica en el tratamiento de la ECV en los pacientes con VIH, en esta tesis hemos investigado la distribución de las partículas y la funcionalidad de las HDL, así como su relación con el GIM-c en los pacientes con VIH.

La heterogeneidad de la HDL ha hecho que se desarrollen distintos métodos para aislarla basados en sus propiedades fisicoquímicas y en su composición química, entre los que se incluyen la ultracentrifugación, la precipitación, la electroforesis, la movilidad iónica, el contenido en apolipoproteínas o la RMN, con la premisa de que fueran mejores predictores de ECV. Sin embargo, la incorporación de estas nuevas tecnologías hace necesaria la unificación de criterios entorno a la partícula para llegar a un consenso a la hora de interpretar los diferentes resultados [168].

Para nuestro estudio las distintas subfracciones de HDL se cuantificaron mediante RMN, una técnica que no requiere del aislamiento previo de las lipoproteínas, evitando manipulaciones. Consiste en someter a la muestra de plasma a la acción de un campo magnético. El sistema detecta las señales emitidas por el número total de grupos metilo terminales de los lípidos existentes en las partículas; los ésteres de colesterol y los TG contribuyen con tres grupos y los fosfolípidos y el colesterol libre con dos. Las distintas características de las señales que se emiten se deben a la orientación de los fosfolípidos que rodean el núcleo lipídico y, por tanto, dependen del tamaño de la partícula, sin que se vean afectadas por la concentración lipídica.

Nuestros resultados muestran que los pacientes VIH que no se encontraban con TAR presentaban una concentración menor de todas las subclases de HDLp con respecto a los sujetos sin infección. En los pacientes con TAR, los niveles plasmáticos de HDLp pequeñas y medianas tendieron a normalizarse, mientras que las HDLp grandes continuaron significativamente disminuidas. En nuestros pacientes, esta concentración de HDLp grandes se asoció inversamente con el GIM-c en un análisis multivariable. Aunque pocos estudios han analizado la relación entre las HDLp y la ECV en pacientes con HIV, un estudio previo de Duprez y col. demostró que niveles bajos tanto de HDLp pequeñas como HDLp grandes se asociaron con un mayor riesgo de padecer ECV [169]. En la población general, la mayor parte de los estudios han demostrado que los pacientes con ECV presentan un incremento en los niveles de HDLp pequeñas y una disminución en los de HDLp grandes, lo que sugeriría un papel protector de las HDLp grandes frente a la ECV [168]. Sin embargo, los datos que demuestran la capacidad de las distintas subclases de HDLp como predictoras del riesgo cardiovascular no son a día de hoy concluyentes [170]. En el estudio *Kupio*, un estudio prospectivo realizado en una población de hombres finlandeses entre 40 y 60 años de edad [171], y en otro realizado en la ciudad de Québec también con un grupo de hombres menores de 60 años [172], se demostró una asociación inversa entre las HDL₂ (grandes) y la ECV. Por el contrario, en

el estudio *Physician's Health* [173], estudio prospectivo realizado en hombres entre 40 y 80 años de edad con 5 años de seguimiento, se observó la existencia de una fuerte asociación inversa entre la HDL₃ (pequeñas y medianas) y la ECV. La disparidad de estos resultados podría ser atribuida a los diferentes métodos de medición de las HDLp usados en los distintos trabajos o a la heterogeneidad probable de las subfracciones con respecto a sus funciones fisiológicas. En este sentido, algunos trabajos han demostrado que las HDLp pequeñas presentan un mayor efecto anti-aterogénico; en particular tienen una mayor capacidad antioxidante y una mayor capacidad para proteger a las células endoteliales de la apoptosis inducida por LDLox [168; 173; 174] en comparación con las HDLp grandes. Por el contrario, otros investigadores apoyan la hipótesis que son las HDLp grandes las que presentan una mayor capacidad antioxidante en comparación con las HDLp pequeñas aunque sea en estas donde la PON-1, principal enzima antioxidante de la HDL, se encuentra en mayores concentraciones [175]. Esta diversidad en la funcionalidad de las distintas subfracciones de HDL puede deberse a la heterogeneidad en la composición de las partículas. Por desgracia, en esta tesis debido al método de cuantificación utilizado para la obtención de las HDLp, no pudimos analizar la funcionalidad/disfuncionalidad de cada una de las subfracciones de la lipoproteína.

Es bien conocido que las propiedades ateroprotectoras de la HDL se pueden ver modificadas bajo ciertas situaciones, tales como en la respuesta de fase aguda o por una situación de inflamación crónica, convirtiéndose en una HDL disfuncional [176; 177]. Algunos trabajos habían descrito que, en los pacientes con VIH, existe una alteración del transporte reverso de colesterol, sugiriéndose una disfuncionalidad de la HDL [178]. Sin embargo, no existían datos a cerca de cómo se encontraban otras funciones de la HDL en estos pacientes, por lo que en este trabajo estudiamos su actividad anti-inflamatoria y antioxidante como más representativas.

La adhesión a la pared endotelial y la consecuente migración y acumulación de los monocitos/macrófagos en el espacio subendotelial representan uno de los primeros pasos en la iniciación y progresión de la lesión arteriosclerótica [179]. La HDL es capaz de inhibir la expresión de MCP-1, la principal citoquina quimioattractante, en las células endoteliales. Además, es capaz de inhibir la adhesión de los monocitos, activados por LDLox o TNF- α a la pared del endotelio. Para valorar la capacidad anti-inflamatoria de la HDL en nuestro trabajo realizamos experimentos de migración celular y de expresión de diferentes moléculas de adhesión *in vitro*. Nuestros resultados demuestran que las HDL de los pacientes con VIH habrían perdido la capacidad de inhibir la migración de los

monocitos, así como la expresión de moléculas de adhesión.

Otra de las funciones más importantes de la HDL es su capacidad para inhibir la oxidación de las LDL en el espacio subendotelial. Cuando la HDL es disfuncional no es capaz de inhibir la oxidación de las partículas de LDL, las cuales se acumulan en el espacio subendotelial donde ejercerían sus efectos nocivos. La LDLox es un potente inductor de la expresión de moléculas inflamatorias y promotora de la diferenciación de los monocitos a macrófagos y su posterior conversión en células espumosas típicas de las placas de arteriosclerosis [180]. En los pacientes con VIH, la HDL no es capaz de inhibir la oxidación de la LDL *in vitro*. Además, estos resultados se correlacionan con lo observado *in vivo*, ya que los pacientes con VIH presentaron concentraciones más elevadas de LDLox en el plasma en comparación con el grupo control. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en pacientes sin infección pero con riesgo de ECV. Navab y col. realizaron un ensayo de fluorescencia que valoraba la capacidad de las HDL para inhibir la oxidación de la LDL. Para este ensayo utilizaron HDL aisladas del plasma de un grupo de pacientes con arteriosclerosis coronaria en los que observaron que sus HDL no eran capaces de inhibir la señal de fluorescencia creada por la LDL cuando se oxidaba, mientras que las HDL del grupo control inhibían significativamente esta señal [181]. Sujetos con desordenes inflamatorios sistémicos tales como lupus eritomatoso o artritis reumatoide, con ECV, con diabetes o con enfermedad renal crónica presentan HDL con mayor capacidad para inducir la expresión de moléculas de adhesión, mayor actividad quimiotáctica y/o incapacidad para prevenir la oxidación de la LDL [180; 182].

Al analizar si la disfuncionalidad de la HDL de los pacientes con VIH podía ser atribuida a cambios en su composición, como había sido sugerido previamente en otros grupos de pacientes (figura 33), observamos que en las HDL aisladas del plasma de los pacientes con VIH había habido un intercambio de proteínas anti-inflamatorias/antioxidantes por proteínas proinflamatorias/pro-oxidantes en comparación con los sujetos control. Estas modificaciones fueron aún más marcadas en los pacientes VIH con TAR. Las HDL de los pacientes con VIH presentaron una menor concentración de ApoA-I y LCAT, y una mayor concentración de SAA que los sujetos control. Confirmando nuestros datos, se ha demostrado que alteraciones en la composición de la HDL (bajas concentraciones de ésteres de colesterol, ApoA-I, PON-1 y LCAT y altos niveles de TG y SAA) provocan una disminución de la capacidad anti-inflamatoria y antioxidante de la lipoproteína que se asocia con inflamación [176; 177].

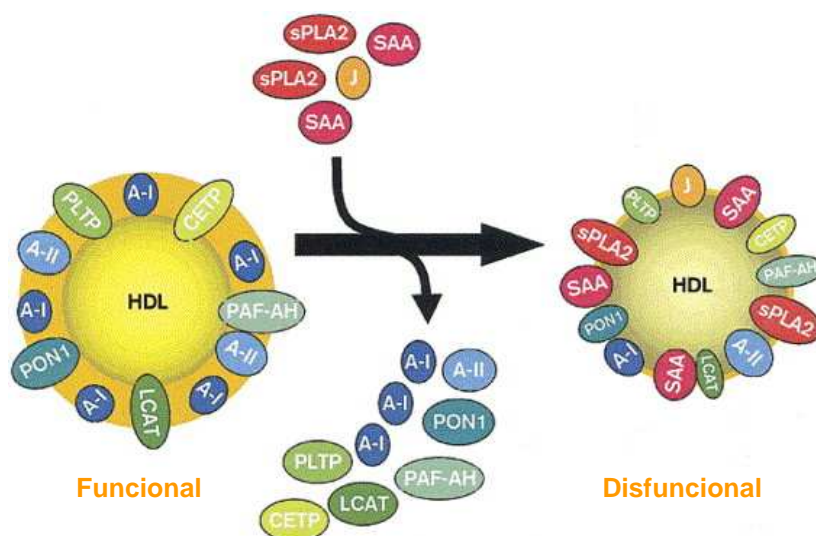


Figura 33. Modificaciones en la composición de la HDL funcional que la convierten en disfuncional.

La ApoA-I es la proteína mayoritaria de la HDL, encargada principalmente del transporte reverso del colesterol desde las células al hígado donde es eliminado. Esta capacidad antiaterogénica de la ApoA-I ha sido ampliamente descrita en múltiples trabajos [183]. En este sentido, estudios previos realizados en pacientes con VIH han demostrado que el transporte reverso de colesterol se encuentra dañado en este grupo de pacientes [184]. Además de su implicación en el transporte reverso de colesterol, estudios *in vivo* han demostrado que la ApoA-I puede actuar como un importante agente anti-inflamatorio, antioxidante y antiaterosclerótico [185; 186]. La administración de péptidos de ApoA-I miméticos, como el L-4F, a ratones deficientes para ApoE conlleva una mejora de la capacidad antioxidante y anti-inflamatoria de sus HDL evaluada en cultivos de células endoteliales aórticas humanas [187]. Durante la inflamación, la ApoA-I puede ser remplazada por el SAA, teniendo como resultado un incremento en el catabolismo de la HDL, una mayor captación de colesterol por parte de los macrófagos y una inhibición de la actividad de la LCAT [188], lo que sugiere un posible vínculo fisiopatológico entre la respuesta inflamatoria y el desarrollo del proceso arteriosclerótico.

Durante el proceso inflamatorio, la HDL aumenta su contenido en TG y disminuye su concentración en ésteres de colesterol asociado a una pérdida en la concentración y actividad de la LCAT, entre otras enzimas implicadas en el proceso del metabolismo/catabolismo de las HDL [189]. Además de su implicación en la formación de la HDL madura, estudios bioquímicos han sugerido que la LCAT ejerce un papel antioxidante a través de su capacidad para hidrolizar los residuos de fosfatidilcolina y ácidos grasos libres oxidados. Estudios *in vivo* realizados en ratones deficientes para el receptor de LDL y de leptina mostraron que una sobreexpresión de la enzima LCAT conllevaba una reducción en la generación de autoanticuerpos frente a LDLox [180].

Las concentraciones plasmáticas de SAA en los pacientes con VIH se encuentran significativamente incrementadas en comparación con sujetos no infectados [190]. Recientemente se ha descrito que los pacientes con enfermedad renal crónica presentan altas concentraciones de SAA en sus HDL, lo cual se correlacionó con una capacidad anti-inflamatoria reducida, ya que no eran capaces de inhibir la expresión de MCP-1 en células vasculares del músculo liso [191]. El SAA durante la respuesta de fase aguda también es capaz de desplazar a la PON-1, a la LCAT y a la LpPLA₂ reduciendo la capacidad de la HDL para proteger a sus lípidos y proteínas de la oxidación.

En este trabajo, hemos cuantificado la concentración y la actividad de la enzima Lp-PLA₂ en las HDL aisladas de los pacientes con VIH. En nuestro trabajo, hemos encontrado que la cantidad de Lp-PLA₂ asociada a las HDL de los pacientes con VIH con TAR era significativamente mayor que la de los controles, un fenómeno que no observamos en los pacientes con VIH sin tratamiento. Este efecto podría ser un mecanismo de defensa inducido por la TAR para inactivar los lípidos bioactivos. Además, se ha demostrado que la Lp-PLA₂ asociada a la HDL, aunque esté presente en niveles bajos en el plasma, es capaz de hidrolizar los fosfolípidos oxidados, contribuyendo a los efectos antiaterogénicos de la lipoproteína [192]. Sin embargo, el papel fisiopatológico de la Lp-PLA₂ a día de hoy no está muy claro. Algunos estudios han demostrado una elevación de los niveles plasmáticos de Lp-PLA₂ en pacientes con enfermedad arteriosclerótica en comparación con los sujetos control, mientras que otros trabajos no han sido capaces de detectar ningún tipo de diferencia o, incluso, han observado que los niveles de Lp-PLA₂ se encontraban disminuidos en los sujetos con enfermedad arteriosclerótica [192]. En este sentido, un estudio previo de nuestro grupo demostró que no existían diferencias en los niveles plasmáticos de Lp-PLA₂ en sujetos VIH con y sin ECV [193]. Parece que son necesarios más estudios para identificar el papel de la Lp-

PLA₂ en el riesgo cardiovascular asociado a los pacientes con VIH.

Los pacientes VIH de nuestro estudio se caracterizaron por presentar HDL disfuncionales, incapaces de realizar correctamente sus funciones biológicas y compuestas principalmente por proteínas proaterogénicas. Para comprobar si existía alguna asociación entre la disfuncionalidad de la HDL y el riesgo cardiovascular de los pacientes, evaluamos el GIM-c, como marcador establecido para el diagnóstico de la arteriosclerosis subclínica [194]. Durante el proceso arteriosclerótico, el GIM-c sufre un aumento progresivo que se relaciona de manera lineal con la incidencia de eventos cardiovasculares, aunque no existe un claro valor de GIM-c que determine ausencia o presencia de riesgo cardiovascular. Se ha demostrado que los pacientes con VIH presentan un mayor GIM-c y una progresión más rápida que la población general no infectada [195]. En nuestro estudio, hemos demostrado que la disfunción de la HDL se asocia con un incremento en el GIM-c.

El uso de la TAR ha convertido la infección por VIH en una enfermedad crónica. Más del 85% de los pacientes con VIH que reciben TAR tienen una esperanza de vida media superior a 10 años desde que contrajeran la infección [4]. Sin embargo, numerosos estudios han sugerido una relación entre el uso de la TAR, principalmente de los IPs, y el desarrollo de la ECV [190]. Nuestro grupo ha demostrado en estudios previos que la exposición prolongada a IPs e ITIANs, pero no a ITINANs, se asociaba con un incremento del GIM-c en los pacientes con VIH [196]. En este trabajo, hemos demostrado que los pacientes con VIH que estaban en tratamiento con ITINANs, presentaban una mayor concentración de HDLp grandes. Sin embargo, aunque la mayoría de los pacientes con VIH con HDL funcionales se encontraban recibiendo TAR, no hemos encontrado ninguna asociación entre las distintas familias de fármacos y la funcionalidad de la lipoproteína. Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cautela debido a que nuestro estudio es de naturaleza transversal y sería necesario, dado que la funcionalidad de la HDL es un proceso dinámico, la realización de estudios longitudinales.

En resumen, nuestros resultados muestran que los pacientes con VIH presentan una alteración en la distribución de las HDLp, así como de su función que se asocia con un incremento del GIM-c y que no es restaurada por el TAR. Somos conscientes de que el proceso de experimentación para cuantificar la funcionalidad de la HDL es laborioso, costoso y difícil de incorporar a la rutina de laboratorio, sin embargo, es posible que deba tenerse en cuenta a la hora de valorar el riesgo cardiovascular en los pacientes con VIH.

5.3. Relación entre los niveles de EPCs y la funcionalidad de la HDL en pacientes con VIH.

Nuestros resultados demuestran que la mayor parte los pacientes con HDL disfuncionales presentan una disminución en los niveles de EPCs CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/VE-cadherina⁺. Recientemente se han publicado algunos estudios que implican a la HDL en la reparación del daño endotelial a través de la estimulación del reclutamiento de EPCs [197; 198; 199]. La HDL puede favorecer la incorporación de las EPCs en injertos, estimulando la reendotelización, y atenuando las lesiones arterioscleróticas [200]. Además, estos autores demostraron que esta función de la HDL depende de su composición más que de su concentración. La sobre-expresión del receptor ABCA-1 en ratones aumentó la concentración plasmática de HDL pero provocó una alteración en la funcionalidad de la HDL que se manifestó por la inhibición de la capacidad migratoria de las EPCs *in vitro* y por una mayor pérdida de células endoteliales [201].

En esta tesis hemos demostrado que los pacientes con VIH presentan alteraciones en los principales mecanismos de reparación del endotelio que podrían ser responsables del desarrollo de la arteriosclerosis prematura que les caracteriza. El TAR, aunque normalizó los valores virológicos e inmunológicos, no solo no restauró estos mecanismos, sino que, en algunos casos incluso los agravó, sugiriendo un efecto directo de los fármacos. Es posible que sean necesarias terapias específicas que incidan sobre los niveles de EPCs y/o la función de las HDL para proteger a los pacientes con VIH del mayor riesgo cardiovascular que presentan.

6. CONCLUSIONES

El estudio de los niveles de EPCs circulantes y de la funcionalidad del colesterol HDL, como principales mecanismos de reparación del daño vascular, en pacientes infectados por VIH nos permite extraer las siguientes conclusiones:

1. Los pacientes infectados por VIH naïve al tratamiento antirretroviral presentan una disminución de los niveles circulantes de EPCs CD34⁺/KDR⁺, CD34⁺/VE-cadherina⁺ y CD14⁺/endoglina⁺ en comparación con sujetos sin infección. En los pacientes con tratamiento antirretroviral, los niveles de EPCs CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/VE-cadherina⁺ continuaron disminuidos, restituyéndose hasta valores normales únicamente las células CD14⁺/endoglina⁺.
2. Estos niveles de EPCs no se asociaron con la presencia de factores de riesgo cardiovascular tradicionales (sexo, tabaco, hipercolesterolemia, hipertensión y diabetes), ni con el grado de inmunosupresión de los pacientes. Sólo el uso del tratamiento antirretroviral se relacionó de forma independiente con la disminución de EPCs CD34⁺/KDR⁺ y el aumento de CD14⁺/endoglina⁺.
3. El tratamiento prolongado durante más de 5 años con cualquiera de los tres principales grupos de antirretrovirales (ITIANs, ITINANs e IPs) se asoció con niveles disminuidos de células CD34⁺/KDR⁺ y mayor GIM-c, aunque solo con los ITIANs y los IPs estas diferencias alcanzaron significación estadística. Por el contrario, no encontramos ninguna asociación entre la concentración de células CD34⁺/VE-cadherina⁺ y CD14⁺/endoglina⁺, el GIM-c y el tratamiento antirretroviral.
4. Los pacientes VIH naïve al tratamiento antirretroviral presentan una menor concentración de todas las subpartículas de HDL (grandes, medianas y pequeñas) en comparación con sujetos control sin infección. En los pacientes en tratamiento antirretroviral se observó una recuperación de las concentraciones de partículas HDL pequeñas y medianas pero no de las grandes, que se mantuvieron similares a las de los pacientes sin tratamiento.
5. Las partículas HDL aisladas de los pacientes con VIH presentan una alteración de su funcionalidad, ya que proporcionan una peor protección frente a la migración de monocitos/macrófagos y a la oxidación del colesterol LDL que las HDL aisladas de sujetos sin infección.

6. Las partículas HDL aisladas de los pacientes con VIH presentan una alteración en su composición caracterizada por una mayor concentración de proteínas proinflamatorias y una disminución de proteínas anti-inflamatorias, lo que podría explicar la alteración de su funcionalidad.
7. Aunque el tratamiento antirretroviral normalizó los valores virológicos e inmunológicos de los pacientes, no restituyó la funcionalidad de la HDL, ya que casi el 68% de los pacientes en tratamiento todavía presentaban HDL disfuncionales.
8. En los pacientes con VIH existe una asociación entre ambos mecanismos de reparación, ya que los pacientes que presentaban los niveles más bajos de EPCs eran los que presentaban también disfunción de la HDL.
9. Los pacientes con VIH con menores concentraciones de EPCs CD34⁺/KDR⁺ y de partículas HDL grandes, así como con un mayor grado de disfuncionalidad de su HDL mostraron un mayor GIM-c, un marcador de la presencia de arteriosclerosis subclínica y de riesgo de evento cardiovascular.

En resumen, nuestros resultados demuestran que los pacientes con infección por VIH muestran una alteración de los mecanismos de reparación del daño vascular que podría explicar el desarrollo de la arteriosclerosis prematura que les caracteriza. El tratamiento antirretroviral, aunque normaliza los valores virales e inmunológicos, no restituye estos mecanismos por lo que es posible que sea necesario incidir en ellos con terapias más específicas para disminuir el riesgo cardiovascular que se observa en estos pacientes en relación a la población general.

7. RESUMEN EN INGLÉS

1. Introduction.

Since the introduction of highly active antiretroviral therapy (ART) in 1995, HIV infection has become a chronic disease. In this scenario, cardiovascular diseases, mainly atherosclerosis, have gained importance as causes of morbidity and mortality [162]. This increase in cardiovascular risk in HIV-infected patients has been attributed to lipid abnormalities characterizing HIV patients, although it is not clear how much can be attributed to the HIV infection, ART treatments, immune activation, inflammation and/or host genetics [193; 195; 202].

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the arterial wall, closely related to the infiltration of monocytes into the subendothelial space and their subsequent differentiation into macrophages [203]. The response to injury hypothesis considers inflammation as a central mechanism responsible for early atherogenesis [41]. Simultaneously, inflammation also orchestrates a process of repair through 3 main defense mechanisms include: endothelial repair by progenitor cells, plaque neovascularization and reverse cholesterol transport by HDL.

In the last years, circulating endothelial progenitor cells (EPCs) have gained importance as a potential endothelial protection mechanism [54; 55]. EPCs are bone marrow-derived cells characterized by the expression of both hematopoietic (CD34 and CD133) and endothelial surface markers such as, KDR [a type of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2)], VE-cadherin, CD31, and von Willebrand factor and by their capacity to contribute to vascular homeostasis [54]. Circulating EPCs could contribute to endothelial repair by homing into sites of endothelial injury to maintain the integrity of the blood vessels [54; 55]. Thus, it has been hypothesized that circulating EPC levels could determine the capacity of repairing the damaged or dysfunctional endothelium. In this sense, traditional cardiovascular risk factors, such as smoking, hyperlipidaemia, hypertension, and diabetes, which are associated with endothelial dysfunction, have been also associated with low levels of EPCs [66]. Furthermore, the depletion in the number of EPCs has been associated with the occurrence of a first major cardiovascular event in patients at different risks or even in healthy subjects [154]. Moreover, restoration of EPC number and/or their functionality is possible through current therapies for cardiovascular risk factors and other means [204; 205], suggesting that they could also be a promising tool for measuring therapeutic efficacy. In small studies with HIV infected patients, alterations in the number and/or functionality of EPCs have also

been reported [152; 206].

Much less is known regarding smooth muscle progenitor cells (SMPCs), circulating cells that express markers of mesenchymal cells [such as endoglin (CD105) or calponin] or of the smooth muscle lineage, such as smooth muscle actin (SMA), smooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC), or smooth muscle-22 (SM-22). Their role in the atherosclerotic process is still controversial, with data suggesting that SMPCs might contribute to both neointima growth and plaque stability [55; 56].

Epidemiological studies have consistently shown an inverse correlation between HDL plasma levels and cardiovascular disease (CVD) both in the general population and in HIV-infected patients [184; 207]. This relationship has been mainly attributed to the capacity of HDL to promote the cholesterol efflux from tissues to the liver [so called “reverse cholesterol transport” (RCT)], which is considered its main protective antiatherogenic mechanism [176]. Recently it has been demonstrated that RCT is an independent predictor of carotid intima-media thickness (c-IMT) and obstructive coronary lesions by angiography, even independently of the plasma HDL concentration [208].

HDL levels could be considered important therapeutic target in HIV-infected patients since they decrease as soon as infection occurs but remains persistently low in ART-treated patients, increasing only under certain ART therapies [195; 209]. Compared with uninfected persons, there is evidence of an increased activity and mass of cholesterol ester transfer protein (CETP) and impaired ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated cholesterol efflux in HIV-infected patients that could result in decreased HDL production [184].

Also, HDL posses other antiatherogenic properties such as antioxidative, anti-inflammatory and anti-thrombotic effects [176; 177]. This wide range of HDL biological activities has been associated with its highly heterogeneity in origin, size, and composition resulting from differences in qualitative and quantitative content of lipids, apolipoproteins, enzymes and lipid transfer proteins [176; 177]. This could explain why some studies have failed to demonstrate low levels of plasma HDL and their presence of in CVD [210], as it should be expected. Therefore, in the last years these findings have turned the attention to the quality, rather than the quantity, of HDL particles (HDLp). In HIV-infected patients, Duprez et al. demonstrated that HDLp identify those patients at increased risk of CVD independently of other risk factors [169].

Therefore, in this study we have investigated the hypothesis that the levels of the circulating endothelial progenitor subpopulations CD34⁺/KDR⁺, CD34⁺/VE-cadherin⁺, and CD14⁺/Endoglin⁺ and the functionality of HDL are impaired in HIV-infected patients compared to uninfected subjects, and that they could be associated with increased c-IMT as a marker of early atherosclerosis [194].

2. Methods.

2.1. Study Population.

The protocol of this study complies with the principles of the Helsinki Declaration and was approved by the Ethics and Clinical Investigation Committee of Hospital Clínico San Carlos. Informed consent was obtained from all subjects.

We included HIV-infected adults attending the HIV Unit of the Hospital Clínico San Carlos in Madrid between October 2009 and June 2011; aged 18 years or older, were eligible to take part in the study. The exclusion criteria were known CVD (previous stroke, myocardial infarction, or intermittent claudication) and/or known chronic kidney disease.

Thirty-two nonsmoker healthy subjects, without evidence of CVD, were evaluated as a control group.

2.2. Clinical and Laboratory Measurements.

Medical records were carefully reviewed at interview, a questionnaire was completed, and a thorough physical examination was performed. Gender, age, anthropometric measurements (weight, height, and waist circumference), systolic and diastolic blood pressures (SBP/DBP), smoking habit, family history of CVD (defined as a major cardiovascular event in one or more first-degree relatives), and accumulated time on nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), on non-NRTIs (NNRTIs), and on protease inhibitors (PIs) was recorded. Body mass index was calculated.

A sample of fasting venous blood was obtained to determine plasma glucose, HDL, and triglycerides using standard enzymatic methods. Low-density lipoprotein cholesterol (LDL) concentrations were calculated using the Friedewald equation [142]. The presence of hypertension, hypercholesterolemia, and hypertriglyceridemia was defined according to the Adult Treatment Panel III criteria [141].

2.3. Quantification of Circulating Endothelial Progenitor Cells.

Peripheral blood cells were analyzed by direct flow cytometry as previously described [143]. Blood cells were stained with anti-CD34 phycoerythrin-cyanin 7 (PC7)-conjugated, anti-CD3 phycoerythrin-Texas Red-x (ECD)-conjugated, anti-KDR phycoerythrin (PE)-conjugated, anti-VE-cadherin (CD144) PE-conjugated, anti-CD14 PC7-conjugated, and anti-endoglin (CD105) PE conjugated. Appropriate isotype controls were used for each staining procedure. After lyse-wash procedure, cells were acquired on a FC500 flow cytometer and mononuclear blood cells (PMNC) were gated after excluding cellular debris in a side scatter/forward scatter dot plot. For each sample, a minimum of 100,000 events was acquired. Progenitor cells were identified as dual CD34+/KDR+, CD34+/VE-cadherin+, or CD14+/Endoglin+ cells in the CD3 negative gate.

The instrument setup was optimized daily by analyzing polystyrene fluorescent microspheres (flow-check[®] fluorospheres; PC7 770/488 setup kit). The same trained operator, who was blinded to the subjects' characteristics, performed all of the tests throughout the study. Results are expressed as percentage of CD34+/KDR+, CD34+/VE-cadherin+ or CD14+/Endoglin+ cells in the PMNC gated area once excluding CD3+ cells.

2.4. Analysis of HDL subclasses.

Plasma samples were analyzed by a commercially available automated proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic assay. HDLp were classified into the following categories: large HDLp, 8.8–13 nm; medium HDLp, 8.2–8.8 nm; and small HDLp, 7.3–8.2 nm [144]. The concentration of particles was then calculated.

2.5. Isolation of LDL and HDL.

LDL and HDL lipoproteins were isolated from serum by sequential ultracentrifugation as previously described [145]. LDL was isolated in the density range 1.019-1.063 g/ml and HDL was isolated in the range 1.063-1.210 g/ml. Both LDL and HDL fractions were dialyzed extensively overnight at 4°C in sodium phosphate buffer and sterilized by passing through a 0.20 µm filter prior to be used. Cholesterol content was measured by enzymatic colorimetric assay.

2.8. HDL Anti-Inflammatory Assay.

This experiment is based on the ability of HDL to interfere with monocyte migration. In brief, the human monocytic cell line THP-1, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA), was maintained in suspension culture in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, and 2 mM glutamine at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. The effects of HDL on the chemotaxis of THP-1 cells were assessed by Transwell[®] cell culture chambers with polycarbonate filters of 5 µm pores. In brief, 10⁵ cells were incubated into the upper compartment of the insert with HDL (0.1 mg cholesterol/mL) isolated from controls or HIV-infected patients at 37°C for 30 minutes. Then, the lower chamber was filled with 100 ng/mL recombinant human MCP-1 and THP-1 cells were allowed to migrate for 2 hours at 37 °C. The lower chamber contents were collected, and the number of migrated cells counted using a FC500 flow cytometer by passing each sample in the same predetermined time and flow conditions. Specific chemotaxis was expressed as the percentage of THP-1 cells that migrated in response to MCP-1 alone that was considered 100%.

2.6. Plasma Levels of oxidized LDL (oxLDL).

The extent of oxidation of plasma LDL was estimated by measuring the concentration of malondialdehyde (MDA) with the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay [146] with some modifications. In brief, 200 µg of LDL was added to tubes containing 125 µL of 5% trichloroacetic acid and 1 mL of 0.6% TBA in a final volume of 3

mL. The tubes were heated for 45 minutes at 95°C and then cooled in ice. After centrifugation, supernatant were transferred to a 96-well plate, and MDA in the supernatant was determined at 532 nm. The values thus obtained were compared with those of a standard curve of MDA generated by hydrolysis of 1,1,3,3'-tetraethoxypropane. The results are expressed as nmol MDA/mg LDL-cholesterol.

2.7. HDL Antioxidant Assay.

This experiment is based on the ability of HDL to inhibit in-vitro copper-induced LDL oxidation. Oxidation of commercial human LDL (150 µg cholesterol) was initiated by exposing it to 5 µM CuSO₄ in the presence or absence of isolated HDL (50 µg cholesterol) at 37°C. After 24 hours, the reaction was stopped by adding an alcoholic solution of 10⁻⁴M butylated hydroxytoluene (BHT) and the oxidation of LDL was measured using the TBARS assay as described above. The results are expressed as nmol MDA/mg HDL-cholesterol.

2.9. HDL-Associated Proteins.

Apo A-I concentration in isolated HDL samples (100 µg cholesterol) was measured using a turbidimetric assay. Commercial ELISAs were used for measurement the levels of Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT), Serum amyloid A (SAA), Lipoprotein-associated to phospholipase A2 (Lp-PLA2) and Lp-PLA2 activity in HDL fractions (100 µg cholesterol). HDL fractions used for measurement of Lp-PLA2 activity were concentrated prior to be used. Results are expressed as protein/mg HDL-cholesterol.

2.10. Carotid intima-media thickness (c-IMT) measurement.

Carotid ultrasonography was performed using an HD7 ultrasound system (Philips®) with a sectorial 12 MHz probe following the criteria of the American association of echocardiography. Both common carotid arteries were identified in the long axis and explored starting 1 cm below the flow divider. The images were recorded in end-diastole and then analyzed by specific validated software (QLab *Quantification Software*, Philips®). c-IMT measurement was carried out in the right carotid artery on areas free of atheroma. Left carotid artery was checked to identify irregular IMT or presence of plaques.

2.11. Statistical Analyses.

Qualitative variables were summarized by their frequency distribution and quantitative variables by their mean and its standard deviation (\pm SD). The continuous non-normally distributed variables were summarized by the median and interquartile range (IQR: P25-P75). The Kolmogorov-Smirnov test was used to prove Gaussian distribution. In case of qualitative variables, comparison was evaluated by the test of χ^2 or by Fisher exact test in case more than 25% of the expected values were less than 5. For continuous normally distributed variables the T-Student test was used to compare between two groups. The Mann-Whitney U test was used for continuous not normally distributed variables. The association between continuous variables was tested using a parametric or a nonparametric correlation coefficient. As the circulating endothelial progenitor cells were not normally distributed, these data were log-transformed to improve their distribution for statistical testing.

Given the absence of a standardized definition of dysfunctional HDL, those subjects who presented chemotaxis rate and/or plasma oxLDL levels above the median (67% migrated cell and 2.4 nmol MDA/mg LDL-cholesterol) were classified as individuals with dysfunctional HDL. The association between circulating vascular progenitor cells, large HDLp (above highest tertile, 5.9 μ mol/L) or dysfunctional HDL and c-IMT (dependent variable) was assessed by multivariate linear regression. Adjustment was with those variables which, in the univariate analyses, showed a level of statistical significance of $P < 0.05$ and/or were considered clinically relevant.

The null hypothesis was rejected by a type I error minor than 0.05 ($P < 0.05$). Statistical analyses were performed using the SPSS 17.0.

3. Results.

The most frequent cardiovascular risk factor was smoking (44.5%), followed by hypercholesterolemia (37.2%), hypertension (16.5%) and diabetes mellitus (9.5%). Twenty-three HIV-infected patients were ART-naïve and 180 were currently being treated with ART. Most patients on ART (83%) had undetectable viral load (< 50 copies/mL). Also naïve HIV patients had lower plasma levels of total cholesterol, LDL cholesterol, and HDL

cholesterol. ART-treated HIV patients recovered the levels of total cholesterol and LDL, and increased triglycerides but HDL cholesterol remained decreased with respect to healthy controls

3.1. Endothelial progenitor cell levels in HIV-Infected patients.

Compared with healthy subjects, HIV-infected patients showed decreased number of CD34+/KDR+ and CD34+/VE-cadherin+ cells. Circulating CD14+/Endoglin+ cells tended to be lower in HIV infected patients than in healthy subjects, although without reaching statistical significance.

ART-naive patients showed lower number of CD34+/KDR+, CD34+/VE-cadherin+ and CD14+/Endoglin+ cells. Treated patients showed further decreased levels of CD34+/KDR+ and CD34+/VE-cadherin+ cells. However, CD14+/Endoglin+ cells were higher in ART-treated patients than in naive patients. The levels of progenitor subtype cells did not seem in relationship with CD4+ lymphocyte count. However, HIV viral load was positively associated with CD34+/KDR+ and negatively with CD14+/Endoglin+ cell levels.

3.2. Association between endothelial progenitor cell levels and c-IMT.

To evaluate the relationship between EPCs and c-IMT, patients were classified into low EPCs group (below 75th percentile) and high EPCs group (equal or above 75th percentile). There were no significant differences in gender, age, cardiovascular risk factors, and viral parameters between the 2 subgroups. However, time exposure to ART was associated to low CD34+/KDR+ and high CD14+/Endoglin+ levels. There was no clear correlation observed between EPCs levels and c-IMT. Patients with low CD34+/KDR+ and CD34+/VE-cadherin+ or increased CD14+/ Endoglin+ cell levels tended to show higher c-IMT, although these differences did not reach statistical significance. Linear regression analysis revealed that c-IMT was significantly associated to age, SBP, glucose, time to HIV diagnosis, and accumulated exposure to NRTI and PI.

3.3. Association between endothelial progenitor cell levels, c-IMT and the use of ART.

To further investigate the role of ART duration in EPCs levels, the effects of NNRTI, NRTI, and PI were analyzed separately. One hundred seventy-two patients (95.6%) were currently prescribed on NRTI, 138 (76.6%) on NNRTI and 114 (63.3%) on PI. Prolonged exposure (accumulated time more than 5 years) to NRTI and PI was associated to both decreased levels of CD34+/KDR+ cells and higher c-IMT. Patients taking NNRTI more than 5 years also showed this tendency although it did not reach statistical significance. In a multivariate regression analysis entering known cardiovascular risk factors and HIV status, time of exposure to PI more than 5 years remained significantly associated with decreased CD34+/KDR+ cell levels.

3.4. HDLp concentration.

Since HDL is composed of a complex array of HDLp, we measured HDLp concentration by NMR. Naïve-HIV patients showed a significant reduction of all subpopulations of HDLp with respect to healthy control subjects. ART-treated patients recovered medium and small HDLp levels showed by healthy controls but large HDLp concentration remained significantly decreased with respect to healthy controls. Between treated HIV-patients, higher large HDLp concentrations were associated with higher accumulated time of exposure to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) therapy.

3.5. HDL functionality.

Compared with HDL isolated from healthy controls, HDL from both naïve and treated-HIV-infected patients showed decreased anti-inflammatory capacity since they were less able to inhibit the MCP-1-induced migration of THP-1 monocytes, without significant differences between HIV-infected patients with or without ART.

Then, we measured the ability of HDL from HIV-patients and healthy subjects to inhibit copper-induced oxidation of LDL by measuring MDA, a biomarker of lipid-related

oxidative stress, which indicates the degree of lipid peroxidation. The levels of MDA were markedly increased when LDL was oxidized in the presence of HDL obtained from HIV-infected patients than that from healthy subjects. The antioxidant ability of HDL was significantly lower in ART-treated HIV-infected patients than in naïve patients.

We quantified the oxidation rate of LDL isolated from plasma of HIV-patients and healthy subjects, and we observed significantly higher levels of oxLDL in HIV-infected patients versus healthy subjects. Impaired HDL antioxidant activity strongly correlated with plasma oxLDL.

Sixty-five patients showed dysfunctional HDL according to our criteria (chemotaxis rate and/or plasma oxLDL levels above the median). No differences were found regarding age, SBP or lipid profile, even HDL cholesterol levels, or viral load and CD4 lymphocyte count between HIV-infected patients with and without dysfunctional HDL. Dysfunctional HDL was more frequently in patients on ART, although it was not associated with a specific antiviral drug family.

3.6. Composition of HDL.

Since changes in the composition of HDL may translate into modifications in its functionality [160; 163], we measured the concentration of Apo A-I, LCAT, SAA and Lp-PLA2 in HDL isolated from HIV-infected patients and healthy subjects.

Levels of Apo A-I and LCAT were significantly lower in HDL from HIV-infected patients than in HDL from healthy subjects, being this difference higher in naïve than in ART-treated HIV patients. In contrast, the HDL concentration on SAA was significantly higher in HIV-infected individuals, mainly in HDL from untreated HIV-infected subjects, than in healthy controls. Lp-PLA2 mass and activity associated to HDL were significantly higher in ART-treated HIV individuals, while naïve HIV patients showed similar Lp-PLA2 mass and activity associated to HDL from healthy subjects. Functional HDL was associated with higher content of apo A-I and LCAT compared to those with dysfunctional HDL.

3.7. Association between HDLp and HDL functionality with subclinical atherosclerosis.

To explore whether HDLp levels or dysfunctional HDL might be associated with higher cardiovascular risk, we assessed their associations with c-IMT, a biomarker of subclinical atherosclerosis [166]. HIV-infected patients with higher concentrations of large HDLp (above highest tertile, 5.9 $\mu\text{mol/L}$) or functional HDL showed lower c-IMT than those with low HDLp or dysfunctional HDL. Both differences remained in a multivariate analysis adjusting for cardiovascular risk factors (age, hypertension, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia) and HIV status (time to HIV diagnosis, time on treatment).

4. DISCUSSION.

HIV-infected patients have a significantly high risk of developing cardiovascular events. Atherosclerosis, the main inducer of several cardiovascular diseases, has been observed in both ART-treated and non-treated HIV-infected patients and its pathogenesis has been related to direct and indirect effects of HIV on vessel structures [211]. In this study we have demonstrated that HIV infection impairs two main defense mechanisms implicated in the cardiovascular homeostasis: the regenerative production of EPCs and HDL concentration and functionality.

Circulating progenitor cells with capacity to differentiate into endothelial or vascular smooth muscle cells (VSMCs) have been identified in human peripheral blood [54; 57]. Meanwhile, EPCs are currently considered key players in the protection and regeneration of endothelium, the role of SMPCs is more unclear [55; 65]. Our data demonstrate that ART exposure was the main predictor of decreased number of CD34⁺/KDR⁺ and CD34⁺/VE-cadherin⁺ cells and increased number of CD14⁺/endoglin⁺ in HIV-infected patients after controlling by traditional cardiovascular risk factors and HIV parameters. However, these alterations of vascular progenitor cells were only partially associated with high c-IMT in our cohort of HIV-infected patients. Our data confirm previous studies using the same methodology reporting that uncontrolled HIV infection is associated with a reduction of CD34⁺/KDR⁺ in comparison with noninfected subjects [152] and extend them demonstrating that the CD34⁺/VE-cadherin⁺ subtype EPC is also decreased. In addition, to our knowledge, this is one of the first studies to have compared the number of

circulating EPCs between ART-naive and treated HIV-infected patients. ART-treated patients showed further decreased levels of CD34⁺/KDR⁺ and CD34⁺/VE-cadherin⁺ cells with respect to naive patients. Some drugs with beneficial cardiovascular actions, such as statins and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors have been reported to increase circulating CD34⁺/KDR⁺ [204]. However, these EPC subtypes decreased in long-term statin treated patients meanwhile the number of CD34⁺/VE-cadherin⁺ EPCs is maintained [212]. Although somewhat controversial, several studies have demonstrated the presence of both resident and circulating SMPCs with potential to trans-differentiate into VSMCs in atherosclerotic lesions [56]. CD14⁺/endoglin⁺ cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) have been identified as an important source of circulating SMPCs [57]. ART-treated patients showed an increment of CD14⁺/endoglin⁺ cell levels with respect to naive patients. Surprisingly, their levels were similar to those displayed by noninfected patients. The precise role of SMPCs is more unclear. There is some evidence demonstrating that these cells may contribute to both vascular physiology and to the development of vascular disease. Patients with coronary artery disease (CAD) showed significantly increased CD14⁺/Endoglin⁺ cells compared with patients without CAD [57] suggesting that mobilization of these cells might promote vascular disease. However, chronic SMPCs injection has demonstrated to limit atherosclerotic lesion development and stabilize the atherosclerotic plaque in an experimental model [161]. In patients with acute coronary syndrome, their deficiency in SMPCs has been associated with plaque vulnerability [56]. Therefore, longitudinal studies will be necessary to conclude the contribution of CD14⁺/endoglin⁺ to the pathogenic mechanism of atherosclerosis in HIV-infected patients.

While the protective effect of HDL on CVD is well established [126], the clinical benefit of both traditional and novel therapies demonstrating to effectively improve HDL levels has been controversial. A 2009 meta-analysis of 108 randomized trials involving nearly 300,000 patients at risk for cardiovascular events using lipid modifying interventions (drugs or diet) failed to demonstrate a benefit of treatment-induced increases in HDL with cardiovascular events and mortality after adjustment for changes in LDL [207], suggesting that these therapies impact in HDL levels but do not restores HDL functionality. This hypothesis is further supported from experimental models and clinical studies. For example, transgenic mice that overexpress mouse apo A-II had higher levels of HDL but exhibited increased atherosclerotic lesion development as compared to normal mice, and the administration of synthetic peptide apo A-I produces a dramatic decrease of atherosclerosis without changing HDL levels [213]. The infusion of HDL-Milano exerts

superior anti-inflammatory and plaque stabilizing effects than HDL-wild-type in the short term, despite a similar effect on acute plaque regression [214]. HDL isolated from patients with several disorders associated with increased risk of atherosclerosis such as systemic lupus erythematosus, end-stage renal disease or metabolic syndrome showed decreased antioxidant activity despite normal HDL levels [213]. In patients with chronic kidney disease on hemodialysis, an impaired anti-inflammatory capacity of HDL was correlated with a poor clinical outcome [215]. Since both the composition and function of HDL appear to be determinant in their anti-atherogenic properties, a more precise characterization of HDL functionality is warranted.

HDL is a plasma lipoprotein highly heterogeneous in its content, resulting in multiple HDLp that can be identified according to physicochemical properties and chemical composition [80]. Methods to subfractionate HDL-cholesterol were developed on the premise that assays involving HDL subpopulations might be superior to HDL levels in predicting coronary heart disease [80; 168]. In a previous study, lower levels of small and large HDLp have been associated with higher risk of CVD in HIV-infected patients [169]. In the general population, several studies have reported that large HDLp are decreased and/or small HDLp increased in patients with CVDs, suggesting that large HDLp may be associated with greater protection for CVD [168]. Unfortunately, none of the prospective studies has confirmed the predictive ability of HDLp to identify patients at cardiovascular risk [168]. The differences in the results of various studies may be attributable to the different assay methods used, or the probable heterogeneity of the subfractions with different physiological functions. Indeed, it has been shown that small HDLp possess more potent anti-atherogenic properties, in particular more antioxidant activity than large HDLp [173]. Furthermore small HDLp have more capacity to protect human microvascular endothelial cells from oxLDL-induced apoptosis than large HDLp irrespective of comparison method [174]. The heterogeneity in the composition of HDLp may translate into distinct functionality of HDL subpopulations. Unfortunately, we could not analyse the functionality/dysfunctionality of the different HDLp.

The atheroprotective properties of HDL can be influenced by certain states, such as acute response or chronic inflammation, leading to dysfunctional HDL and losing its cardioprotective effect [176]. This dysfunctionality has been associated with a switch between antioxidant/anti-inflammatory and pro-oxidant/proinflammatory protein composition. In our study, the composition analysis of isolated HDL showed lower content of Apo A-I and LCAT, and higher content of SAA in both HDL from naïve and ART-treated

HIV-infected patients than in those from control subjects, and importantly, some of these alterations being stronger in ART-treated patients. Apo A-I is the major protein in HDL and plays an important role in the cellular cholesterol efflux [216] and, although we have not measured RCT in our samples, previous studies have reported a RCT damaged in HIV-infected patients [184]. During inflammation, Apo A-I can be replaced by SAA, which may result in increased HDL catabolism and uptake of cholesterol by macrophages, and inhibited LCAT activity [188]. In this sense, the plasma SAA levels in HIV-positive subjects are significantly increased when compared with normal subjects [190]. One lipid are oxidized in LDL, they are transferred to HDL to be hydrolyzed by enzymes such as Lp-PLA2. HDL-associated Lp-PLA2 activity, although present at low levels in plasma, may significantly contribute to the antiatherogenic effects of this lipoprotein [192]. In our study, Lp-PLA2 mass was significantly higher only in ART-treated patients with respect to control subjects, although this increment was not associated with an increase in the enzymatic activity. This effect could represent a failure in the mechanisms of protection against bioactive lipids induced by ART. In this sense, our data demonstrate that ART-therapy did not restored HDL functionally (measured as chemotaxis rate and/or plasma oxLDL levels), despite most treated HIV-infected patients normalized virologic and immunologic parameters and showed less systemic inflammation than naïve HIV patients. In agreement with our data, a previous small pilot study demonstrated that ART-treated HIV-infected individuals with suppressed viremia showed a marked reduction of HDL anti-inflammatory activity tested for its ability to inhibit LDL-induced MCP-1 production in human aortic endothelial cell culture [217].

Increased c-IMT is an early marker of atherosclerosis and a potent predictor of future vascular events [163]. Although the correlation between c-IMT and cardiovascular events in HIV-infected patients has not been still demonstrated, several studies demonstrate that HIV-infected patients show an increased and more rapid progression of c-IMT than uninfected subjects [195]. Our data show that HIV-infected patients with low number of CD34⁺/KDR⁺ and/or CD34⁺/VE-cadherin⁺ cells, low concentrations of large HDLp or dysfunctional HDL showed increased c-IMT with respect to those with high EPCs number, higher concentrations of large HDLp or functional HDL.

Numerous studies have suggested a relationship between the use of ART, mainly PIs, and the development of atherosclerosis [162]. We have demonstrated that accumulated exposure to PIs and to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), but not to NNRTIs, was associated with increased c-IMT. In addition, accumulated ART

exposure, mainly PI therapy, was the most powerful predictor of low levels of CD34⁺/KDR⁺ and CD34⁺/VE-cadherin⁺ EPCs. Besides, in this study, we observed that patients with higher accumulated time on NNRTI displayed higher levels of large HDLp. However, most of HIV-patients with dysfunctional HDL were on ART, although we did not find any association with specific ART drug families. These results should be interpreted with caution due to the cross-sectional nature of our study. Given the fact that HDL functionality could be a dynamic process, longitudinal follow up comparing the specific effect of different antiretroviral drugs might help to enlighten these questions. Similarly, prospective studies will be required to explore whether HDLp and/or HDL function could be predictors of the progression of atherosclerosis in HIV-infected patients. In this sense, Kelesidis et al have recently reported that oxidized HDL evaluated with a biochemical parameter was not associated with changes in c-IMT in HIV-infected subjects [217]. However, this data needs to be validated in large-scale human studies and with a more physiological evaluation of HDL functionality.

In summary, our results demonstrate that HIV-infected patients show impaired endothelium repair mechanisms that would lead to the development of premature atherosclerosis. We have demonstrated that HIV-infected patients had altered endothelial progenitor cells circulating levels, as well as HDLp concentration and HDL functionality in association with increased c-IMT. ART-therapy normalized virologic and immunologic parameters but did not restore endothelial progenitor cells levels and HDL functionality. In the future, therapies aimed to restore these mechanisms will be important to reduce cardiovascular risk in HIV-infected patients, being important from both a clinical and public health perspective.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Palella FJ Jr, Baker RK, Moorman AC, Chmiel JS, Wood KC, Brooks JT, Holmberg SD; HIV Outpatient Study Investigators. Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;43(1):27-34.
2. Triant V. Cardiovascular Disease and HIV Infection. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2013; 10:199-206.
3. Hsue PY, Lo JC, Franklin A, Bolger AF, Martin JN, Deeks SG y col. Progression of atherosclerosis as assessed by carotid intima-media thickness in patients with HIV infection. *Circulation*. 2004; 109(13):1603-1608.
4. Giannarelli C, Klein RS, Badimon JJ. Cardiovascular implications of HIV-induced dyslipidemia. *Atherosclerosis*. 2011; 219:384-389.
5. Larrousse M y Martínez E. Enfermedad cardiovascular en el paciente infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Hipertens riesgo vasc*. 2010; 27(4):162–170.
6. Bozzette SA, Ake CF, Tam HK y col. Cardiovascular and cerebrovascular events in patients treated for human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 2003; 348:702–10.
7. Friis-Moller N, Sabin CA, Weber R, D'Arminio MA, El Sadr WM, Reiss P y col. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003; 349(21):1993-2003.
8. El Sadr WM, Lundgren JD, Neaton JD, Gordin F, Abrams D, Arduino RC y col. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med*. 2006; 355(22):2283-2296.
9. Garg H, Joshi A y Mukherjee D. Cardiovascular Complications of HIV Infection and Treatment. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. 2013; 11: 58-66.

10. Anastos K, Lu D, Shi Q, Tien PC, Kaplan RC, Hessol NA, Cole S, Vigen C, Cohen M, Young M, Justman J. Association of serum lipid levels with HIV serostatus, specific antiretroviral agents, and treatment regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007; 45(1):34-42.
11. Fontas E, Van Lent F, Sabin CA, Friis-Møller N, Rickenbach M, d'Arminio Monforte A, Kirk O, Dupon M, Morfeldt L, Mateu S, Petoumenos K, El-Sadr W, de Wit S, Lundgren JD, Pradier C, Reiss P; D:A:D Study Group. Lipid profiles in HIV-infected patients receiving combination antiretroviral therapy: are different antiretroviral drugs associated with different lipid profiles?. *J Infect Dis.* 2004; 189(6):1056-74.
12. Parienti JJ, Massari V, Rey D, Poubeau P, Verdon R; SIROCCO study team. Efavirenz to nevirapine switch in HIV-1-infected patients with dyslipidemia: a randomized, controlled study. *Clin Infect Dis.* 2007; 45(2):263-6.
13. Dave T, Ezhilan J, Vasawala H, Somani V. Plaque regression and plaque stabilisation in cardiovascular diseases. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013;17(6):983-9.
14. Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, Montero M, Calvo N, Tous M y col. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation.* 2004; 110(15):2204-2209.
15. Lim S, Park S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis. *BMB Rep.* 2014. (Epub ahead of print).
16. Pepine CJ. The effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial dysfunction: potential role in myocardial ischemia. *Am J Cardiol.* 1998; 82(10A):23S-27S.
17. Wolf D, Stachon P, Bode C, Zirlik A. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Hamostaseologie.* 2013; 17:34(1).
18. Blanco JJ, García IS, Cerezo JG, de Rivera JM, Anaya PM, Raya PG et al. Endothelial function in HIV-infected patients with low or mild cardiovascular risk. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(1):133-139.

19. Kanmogne GD, Primeaux C, Grammas P. Induction of apoptosis and endothelin-1 secretion in primary human lung endothelial cells by HIV-1 gp120 proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 333(4):1107-1115.
20. González-Quesada C and Frangogiannis NG. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 as a biomarker in acute coronary syndromes. *Curr Atheroscler Rep.* 2009; 11(2): 131-8.
21. Zhao Q. Dual targeting of CCR2 and CCR5: therapeutic potential for immunologic and cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol.* 2010; 88(1): 41-55.
22. Alonso-Villaverde C. Fisiopatología de la enfermedad cardiovascular en pacientes con VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27(Supl.1):33-39.
23. Arese M, Ferrandi C, Primo L, Camussi G, Bussolino F. HIV-1 Tat protein stimulates in vivo vascular permeability and lymphomononuclear cell recruitment. *J Immunol.* 2001; 166(2):1380-1388.
24. Choi A, Scherzer R, Bacchetti P, Tien PC, Saag MS, Gibert CL et al. Cystatin C, Albuminuria, and 5-Year All-Cause Mortality in HIV-Infected Persons. *Am J Kidney Dis.* 2010; 56(5):872-82.
25. Park IW, Wang JF, Groopman JE. HIV-1 Tat promotes monocyte chemoattractant protein-1 secretion followed by transmigration of monocytes. *Blood.* 2001; 97(2):352-358.
26. Liu J, Hong Y, D'Agostino RB, Sr., Wu Z, Wang W, Sun J y col. Predictive value for the Chinese population of the Framingham CHD risk assessment tool compared with the Chinese Multi-Provincial Cohort Study. *JAMA.* 2004; 291(21):2591-2599.
27. Alon R y Ley K. Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2008; 20(5): 525-32.
28. Evans EA and Calderwood DA. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science.* 2007; 316(5828): 1148-53.

29. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003; 170(2): 191-203.
30. Cracowski JL, Ormezzano O. Isoprostanes, emerging biomarkers and potential mediators in cardiovascular diseases. *Eur Heart J*. 2004; 25(19):1675-1678.
31. Zheng YH, Plemenitas A, Fielding CJ, Peterlin BM. Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:8460-8465.
32. Badimón L, Vilahura G, Padró T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. *Rev Esp Cardiol*. 2009; 62(10):1161-78.
33. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001; 104(3): 365-72.
34. Michel JB. Contrasting outcomes of atheroma evolution: intimal accumulation versus medial destruction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21(9): 1389-92.
35. Silence J, Collen D and Lijnen HR. Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ Res*. 2002; 90(8): 897-903.
36. Holme PA, Muller F, Solum NO, Brosstad F, Froland SS, Aukrust P. Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection. *FASEB J*. 1998; 12(1):79-89.
37. Libby P. Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009; 50:S352-S357.
38. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ y Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J*. 2010; 74(2): 213-20.
39. Jiang B, Hebert VY, Li Y, Mathis JM, Alexander JS, Dugas TR. HIV antiretroviral drug combination induces endothelial mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species production, but not apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;

- 224(1):60-71.
40. Gómez-Garre D, Marcos J y Fernández-Cruz A. Genética y aterotrombosis. En: L.d. comunicación, editor; 2008. p.227-244.
 41. Moreno P, Sanz J, Fuster V. Promoting mechanisms of vascular health: circulating progenitor cells, angiogenesis, and reverse cholesterol transport. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009; 53(25):2315-23.
 42. Asahara T, Murohara T, Sullivan A y col. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997; 275:964-7.
 43. Khan SS, Solomon MA y McCoy Jr JP. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B*. 2005; 64:1-8.
 44. Civin CI, Banquerigo ML, Strauss LC y Loken MR. Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp. Hematol*. 1987; 15:10-17.
 45. Delia D, Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, Soligo D, Pierotti MA y Greaves MF. CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood*. 1993; 81:1001-1008.
 46. Puri KD, Finger EB, Gaudernack G y Springer TA. Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human tonsil high endothelial venules. *J Cell Biol*. 1995; 131:261-270.
 47. Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arteriocler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 1584-1595.
 48. Nowak G, Karrar A, Holmen C, Nava S, Uzunel M, Hultenby K y Sumieran-Holgersson S. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or Tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization. *Circulation*. 2004; 110:3699-3707.

49. Yin H, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J y Buck DW. AC133, a novel marker for human haematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997; 90, 5002-5012.
50. Mizrak D, Brittan M y Alison MR. CD133: molecule of the moment. *J Pathol*. 2008; 214: 3-9.
51. Bloom AL, Giddings JC y Wilks CJ. Factor 8 on the vascular intima: possible importance in haemostasis and thrombosis. *Nat New Biol*. 1973; 241, 217-219.
52. Stockinger H, Gadd SJ, Eher R, Majdic O, Schreiber W, Kasinrerck W, Strass B, Schnabl E y Knapp W. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J Immuno*. 1990; 145, 3889-3897.
53. Mutin M, Dignat-George F y Sampol J. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue Antigens*. 1997; 50:449-458.
54. Sen S, McDonald SP, Coates PTH y col. Endothelial progenitor cells: a novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci (London)*. 2011; 120:263–283.
55. Hristov M, Weber C. Progenitor cell trafficking in the wall. *J Thromb Haemost*. 2009; 7(1):31–34.
56. Orlandi A, Bennett M. Progenitor cell-derived smooth muscle cells in vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2010; 79:1706–1713.
57. Sugiyama S, Kigiyama K, Nakamura S y col. Characterization of smooth muscle-like cells in circulating human peripheral blood. *Atherosclerosis*. 2006; 187:351–362.
58. Hristov M, Zerneck A, Liehn EA y Weber C. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb Haemostasis*. 2007; 98: 274-277.

59. Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol.*2007; 49:741-52.
60. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Batidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP y Gurtner GC. Progenitor cell Trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med.* 2004; 10, 858-864.
61. Heiisig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MAS y col. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell.* 2002; 109, 625-637.
62. Zerneck A y col. SDF-1 α /CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ. Res.* 2005; 96:784-791.
63. Urbich C y col. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 39: 733-742.
64. Ma ZL, Mai XL, Sun JH y col. Inhibited atherosclerotic plaque formation by local administration of magnetically labelled endothelial progenitor cells (EPCs) in a rabbit model. *Atherosclerosis.* 2009; 205(1):80-6.
65. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001; 89: e1–e7.
66. Fadini GP, Agostini C, Sartore S y col. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2007; 194:46–54.
67. Alfonso F, Bermejo J, Segovia J. Enfermedad cardiovascular en la mujer: Por qué ahora?. *Rev Esp Cardiol.* 2006, 59 (3): 259 – 263.
68. López García-Aranda V; Cruz Fernández JM; García Rubira JC; Castro Fernández A; García Sosa R; González-Valdayo López M; Trujillo Barraquero F; Villalba JR.

- El tabaco como factor de riesgo cardiovascular. Importancia de la actuación desde la especialidad de cardiología. *Clín Cardiovasc.* 2000, 18 (1): 11-20.
69. Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, Menegolo M, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45(9):1449-57.
70. Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, Wang XX, Zhu JH, Zhu JH. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond).* 2004;107(3):273-80.
71. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation.* 2004; 109(13):1615-22.
72. Dong C, Goldschmidt-Clermont PJ. Endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for cardiovascular disease. *J Interv Cardiol.* 2007; 20:93-9.
73. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973; 180:1332-9.
74. Di Angelantonio E y col. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA.* 2009; 302; 1993-2000.
75. Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:712-9.
76. Williams DL, Connelly MA, Temel RE y col. Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol.* 1999; 10:329-39.
77. Takahashi Y, Smith JD. Cholesterol efflux to Apolipoprotein A-I involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci*

- USA. 1999; 96:11358-63.
78. Petoumenos V, Nickenig G, Werner N. High density lipoprotein exerts vasculoprotection via endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med.* 2009; 13(11-12):4623-4635.
79. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 1955; 34:1345-53.
80. Rosenson RS y col. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem.* 2011; 57:392-410.
81. Camont L, Chapman MJ y Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends in Molecular Medicine.* 2011; 17(10): 594-603.
82. Rader D. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest.* 2006; 116:3090-100.
83. Davidson WS y Thompson TB. The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2007; 282:22249-22253.
84. Weng W, Breslow J. Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in Apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for Apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:14788-94.
85. Rye K, Barter P. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor Apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:421-8.
86. Rye KA, Clay MA y Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis.* 1999; 145:227-238.

87. Babiak J, Tamachi H, Johnson FL., Parks JS y Rudel LL. Lecithin:cholesterol acyltransferase-induced modifications of liver perfusate discoidal high density lipoproteins from African green monkeys. 1986. *J. Lipid Res.* 27:1304-1317.
88. Brown M, Inazu A, Hesler C y col. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature.* 1989; 342:448-51.
89. Inazu A, Brown M, Hesler C y col. Increased high-density lipoproteins levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med.* 1990; 323:1234-8.
90. Rubine EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human Apolipoprotein A-I. *Nature.* 1991; 353:265-7.
91. Malik S. Transcriptional regulation of the Apolipoprotein A-I gene. *Front Biosci.* 2003; 8:d360-8.
92. Ribas V, Sánchez-Quesada J, Antón R y col. Human Apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res.* 2004; 95:789-97.
93. McCombs RJ, Marcadis DE, Ellis J, Weinberg RB. Attenuated hypercholesterolemic response to a high-cholesterol diet in subjects heterozygous for the Apolipoprotein A-IV-2 allele. *N Engl J Med.* 1994; 331:706-10.
94. Ostos M, Conconi M, Vergnes L y col. Antioxidative and antiatherosclerotic effects of human Apolipoprotein A-IV in Apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:1023-8.
95. Schachater N. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2001; 12:297-304.

96. Eric Bonnet, Jean-Bernard Ruidavets, Joe L Tuech, Jean Ferrie Res, Xavier Collet, Josette Fauvel, Patrice Massip y Bertrand Perret. Apoprotein C-III and E-Containing Lipoparticles are Markedly Increased in HIV-Infected Patients Treated with Protease Inhibitors: association with the development of Lipodystrophy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001; 86(1):296-302.
97. Goldstein J, Hobbs H, Brown M. Familial Hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Baudet AL, Sly WS, Valle D, eds. In: McGraw-Hill, ed. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York. 2001.
98. Srivastava R. Apolipoprotein E gene expression is reduced in Apolipoprotein A-I transgenic mice. *Mol Cell Biochem*. 2000; 209:125-9.
99. Bates SR, Coughlin BA, Mazzone T, Borensztajn J, Getz GS. Apoprotein E mediates the interaction of b-VLDL with macrophages. *J Lipid Res*. 1987; 28:787-797.
100. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest*. 1995; 96:2758-67.
101. Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lloyd AR, Michiel DF, Bausserman LL, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J exp Med*. 1994; 180:203-209.
102. Badolato R, Johnston JA, Wang JM, McVicar D, Xu LL, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Serum amyloid A induces calcium mobilization and chemotaxis of human monocytes by activating a pertussis toxin-sensitive signalling pathway. *J immunol*. 1995; 155(8):4004-10.
103. Malle E, Bollmam A, Steinmetz A, Gemsa D, Leis HJ, Sattler W. Serum amyloid A (SAA) protein enhances formation of cyclooxygenase metabolites of activated human monocytes. *FEBS Lett*. 1997; 419:215-219.

104. Uhlir C, Whitehead A. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem.* 1999; 265:501-523.
105. Huang Y, Von Eckardstein A, Assmann G. Cell-derived unesterified cholesterol cycles between different HDLs and LDL for its effective esterification in plasma. *Arterioscler Thromb.* 1993; 13: 445-58.
106. Asztalos B, Schaefer E, Horvath K y col. Role of LCAT in HDL remodelling: investigation of LCAT deficiency states. *J Lipid Res.* 2007; 48:592-9.
107. Lambert G, Sakai N, Vaisman BL, Neufeld EB, Marteyn B, Chan CC, Paigen B, Lupia E, Thomas A, Striker LJ, Blanchette-Mackie J, Csako G, Brady JN, Costello R, Striker GE, Remaley AT, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. Analysis of glomerulosclerosis and atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase-deficient mice. *J Biol Chem.* 2001; 276: 15090-8.
108. Forte TM, Oda MN, Knoff L, Frei B, Suh J, Harmony JA, Stuart WD, Rubin EM, Ng DS. Targeted disruption of the murine lecithin: cholesterol acyltransferase gene is associated with reductions in plasma paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities but not in apolipoprotein J concentration. *J Lipid Res.* 1999; 40:1276-83.
109. Berard AM, Foger B, Remaley A, Schamburek R, Vaisman BL, Talley G, Paigen B, Hoyt RF Jr, Marcovina S, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithin-cholesteryl acyltransferase. *Nat Med.* 1997; 3:744-9.
110. Vohl MC, Neville TA, Kumarathasan R, Braschi S, Sparks DL. A novel lecithin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation. *Byochemistry.* 1999; 38: 5976-81.
111. Scanu AM, Edelstein C. HDL: bridging past and present with a look at the future. *FASEB J.* 2008; 22:4044-54.
112. Murakami Y, Kamiyama S, Howlader ZH, Yamato T, Komai M, Furukawa Y. Lecithin: cholesterol acyltransferase is insufficient to prevent oxidative modification

- of low-density lipoprotein. *J Biochem* (Tokyo). 2002; 131: 17-9.
113. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JA. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry*. 1994; 33:832-9.
114. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1995a; 96:2882-91.
115. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hidrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J*. 2001; 354:1-7.
116. Rozenberg O, DM Shih, M Aviram. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:461–467.
117. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and paraoxonase. *Atherosclerosis*. 2002; 161:307-316.
118. Rosenblat M, J Vaya, DM Shih, M Aviram. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporters in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*. 2005; 179:69–77.
119. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*. 1998; 394:284-7.
120. Parra Sandra, Carlos Alonso-Villaverde, Blai Coll, Natalia Ferré, Judit Marsillach, Gerard Aragonés, Michel Mackness, Bharti Mackness, Lluís Masana, Jorge Joven,

- Jordi Camps. Serum paraoxonase-1 activity and concentration are influenced by human immunodeficiency virus infection. *Atherosclerosis*. 2007; 194:175-181.
121. Stremier KE, Stafforini DM, Precott SM, McIntyre TM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *J Biol Chem*.1991; 266:11095-103.
 122. Khovidhunkit W, Memon RA, Shigenaga JK y col. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *Metabolism*. 1999; 48:1524-1531.
 123. Qiu X, Mistry A, Ammirati M y col. Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat Struct Mol Biol*. 2007; 14:106-13.
 124. Shah PK. The Yin y Yang of cholesteryl ester transfer protein in cardiovascular disease. *Circulation*. 2009; 120:2408-10.
 125. 125 Barter P. CETP and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 2029-31.
 126. Barter P, Caulfield M, Eriksson M y col. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007; 357: 2109-22.
 127. Settasatian N, Duong M, Cutiss L y col. The mechanism of the remodelling of high density lipoproteins by phospholipids transfer protein. *J Biol Chem*. 2001; 276:26898-905.
 128. Applebaum-Bowden D. Lipases and lecithin: cholesterol acyltransferase in the control of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 1995; 6:130-5.
 129. Olivecrona G, Olivecrona T. Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1995; 6:291-305.
 130. Jahangiri A, Rader D, Marchadier D, Curtiss L, Bonnet D, Rye K. Evidence that endothelial lipase remodels high density lipoproteins without mediating the dissociation of Apolipoprotein A-I. *J Lipid Res*. 2005; 46:896-903.

131. Ma K, Cilingiroglu M, Otvos J, Ballantyne C, Marian A, Chan L. Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:2748-53.
132. Jansen H. Hepatic lipase: friend or foe and under what circumstances?. *Curr Atheroscler Rep*. 2004; 6:343-7.
133. Navab M, Reddy ST, Brian J, Van Lenten, Fogelman AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat. Rev. Cardiol*. 2011; 8:222–232.
134. Tabet F y Rye KA. High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress. *Clinical Science*. 2009; 116:87-98.
135. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM y col. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res*. 2000; 41:1495-1508.
136. Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ y col. Relationship of paraoxonase-1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *J Am Med Assoc*. 2008; 299:1265-1276.
137. McMahon M, Grossman J, FitzGerald J y col. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006; 54:2541-2549.
138. Calabresi L y col. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:1724-1731.
139. Mineo C, Deguchi H, Griffin J, Shaul P. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res*. 2006; 98:1352-64.
140. Li Y e col. Human ApoA-I overexpression diminishes LPS-induced systemic inflammation and multiple organ damage in mice. *Eur. J. Pharmacol*. 2008; 590:417-422.

141. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106:3143–3421.
142. Gómez F, Camps J, Simó JM y col. Agreement study of methods based on the elimination principle for the measurement of LDL- and HDL-cholesterol compared with ultracentrifugation in patients with liver cirrhosis. *Clin Chem*. 2000; 46:1188–1191.
143. Redondo S, Hristov M, Gordillo-Moscoso AA y col. High-reproducible flow cytometric endothelial progenitor cell determination in human peripheral blood as CD34+/CD144+/CD3- lymphocyte sub-population. *J Immunol Methods*. 2008; 335:21–27.
144. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. *Clin Chem*. 1992; 38:1632-1638.
145. Schumaker VN y Puppione DL. Sequential flotation ultracentrifugation. *Methods Enzymol*. 1986; 128:155-70.
146. Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem*. 1993; 208:10–15.
147. Stein JH, Korcarz CE, Hurst T, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, Najjar SS, Rembold CM, Post WS. Use of Carotid Ultrasound to Identify Subclinical Vascular Disease and Evaluate Cardiovascular Disease Risk: A Consensus Statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr*. 2008; 21:2: 93-111.
148. Secil M, Altay C, Gulcu A, Cece H, Goktay AY, Dicle O. Automated measurement of intima-media thickness of carotid arteries in ultrasonography by computer

- software. *Diagn Interv Radiol*. 2005; 11(2):105-108.
149. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005; 353:999-1007.
150. Gunther Marsche, Marcus D. Saemann, Akos Heinemann, Michael Holzer. Inflammation alters HDL composition and function: Implications for HDL-raising therapies. *Pharmacology and Therapeutics*. 2013; 137:341-351.
151. Zhang M, Malik AB, Rehman J. Endothelial progenitor cells and vascular repair. *Curr Opin Hematol*. 2014.
152. Teofili L, Lachininoto MG, Capodimonti S y col. Endothelial progenitor cell trafficking in human immunodeficiency virus-infected persons. *AIDS*. 2010; 24:2443–2450.
153. López M, Vispo E, Román J y col. High risk of endothelial dysfunction in HIV individuals may result from deregulation of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011; 28(7):656-9.
154. Fadini GP, Coracina A, Baesso I y col. Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke*. 2006; 37:2277–2282.
155. Kline ER, Sutliff RL. The roles of HIV-1 proteins and antiretroviral drug therapy in HIV-1-associated endothelial dysfunction. *J Investig Med*. 2008; 56:752–769.
156. Xiao Q, Kiechl S, Patel S y col. Endothelial progenitor cells, cardiovascular risk factors, cytokine levels and atherosclerosis—results from a large population-based study. *PLoS One*. 2007; 2:e975.
157. Luetkemeyer AF, Havlir DV, Currier JS. Complications of HIV disease and antirretroviral therapy. *Top HIV Med*. 2010; 18:57-65.
158. Wang X, Chai H, Yao Q, Chen C. Molecular mechanisms of HIV protease inhibitor-induced endothelial dysfunction. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;44:493-499.

159. Liekens S, Schols D, Hatse S. CXCL12-CXCR4 axis in angiogenesis, metastasis and stem cell mobilization. *Curr Pharm Des.* 2010; 16:3903–3920.
160. Gómez Garre D, Fernández Pinilla C, Muñoz-Pacheco P, Fuster Tozer M, Ortega Hernández A, Álvarez López C, Ortega Madueño I, Estrada Pérez V, Fernández-Cruz A. Efecto de la deshabituación tabáquica sobre los biomarcadores de riesgo coronario CD40L y Lp-PLA2 en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humano (VIH). *Hipertensión* 2011;28:15.
161. Zoll J, Fontaine V, Gourdy P, et al. Role of human smooth muscle cell progenitors in atherosclerotic plaque development and composition. *Cardiovasc Res.* 2008; 77:471–480.
162. Hakeem A, Bhatti S, Cilingiroglu M. The spectrum of atherosclerotic coronary artery disease in HIV patients. *Curr Atheroscler Rep.* 2010; 12:119–124.
163. Lorenz MW, Von Kegler S, Steinmetz H y col. Carotid intima-media thickening indicates a higher vascular risk across a wide age range: prospective data from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Stroke.* 2006; 37:87–92.
164. Oliviero U, Bonadies G, Apuzzi V, Foggia M, Bosso G, Nappa S, Valvano A, Leonardi E, Borgia G, Castello G, Napoli R, Saccà L. Human immunodeficiency virus per se exerts atherogenic effects. *Atherosclerosis* 2009;204:586-589.
165. Ruiz E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A y col. EPC adhesion to arteries from diabetic and non-diabetic patients: effect of pioglitazone. *Front Biosci.* 2009; 14:3608–3618.
166. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res.*2012;110:624-637.
167. Badimón JJ, Ibáñez B. Increasing high-density lipoprotein as a therapeutic target in atherothrombotic disease. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63(3):323-33.
168. Superko HR, Pendyala L, Williams PT, Momary KM, King III SB, Garrett BC. High-density lipoproteina subclasses and their relationship to cardiovascular disease.

- Journal of Clinical Lipidology*. 2012; 6:496-523.
169. Duprez DA, Kuller LH, Tracy R, Otvos J, Cooper DA, Hoy J, Neuhaus J, Paton NI, Friis-Moller N, Lampe F, Liappis AP, Neaton JD; INSIGHT SMART Study Group. Lipoprotein particle subclasses, cardiovascular disease and HIV infection. *Atherosclerosis* 2009;207:524-9.
 170. Movva R and Rader DJ. Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clinical Chemistry*. 2008. 54(5):788-800.
 171. Salonen JT, Salonen R, Seppanen K, Rauramaa R, Tuomilehto J. HDL, HDL₂ and HDL₃ subfractions, and the risk of acute myocardial infarction. A prospective population study in eastern Finnish men. *Circulation*. 1991; 84:129-39.
 172. Lamarche B, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP. Associations of HDL₂ and HDL₃ subfractions with ischemic heart disease in men: prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:1098-105.
 173. Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1991. 352:373-81.
 174. De Souza JA, Vindis C, Negre-Salvayre A y col. Small, dense HDL3 particles attenuates apoptosis in endothelial cells: Pivotal role of apolipoprotein A-I. *J Cell Mol Med* 2010;14:608–620.
 175. Asztalos BF, Tani M y Schaefer EJ. Metabolic and functional relevance of HDL subspecies. *Curr Opin in Lipidol*. 2011; 22:176-185.
 176. Kontush A, Chapman M. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev*. 2006; 58:342-74.
 177. Eren E, Yilmaz N, Aydin O. High density lipoprotein and it's dysfunction. *Open Biochem J* 2012;6:78-93.

178. Baiba K. Gillard, Joe L. Raya, Raul Ruiz-Esponda, Dinakar Iyer, Ivonne Coraza, Ashok Balasubramanyam, Henry J. Pownall. Impaired lipoprotein processing in HIV patients on antiretroviral therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33:00-00.
179. Annema W, von Eckardstein A. High-Density Lipoproteins. Multifunctional but Vulnerable Protections from Atherosclerosis. *Circulation Journal.* 2013; 77:2432-2448.
180. Riwanto M, Landmesser U. High-density lipoproteins and Endothelial Functions: Mechanistic Insights and Alterations in Cardiovascular Disease. *J Lipid Res.*2013.
181. Navab, M., S. Y. Hama, G. P. Hough, G. Subbanagounder, S. T. Reddy, and A. M. Fogelman. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. 2001. *J Lipid Res* **42**: 1308-1317.
182. Khovidhunkit W, Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J Infect Dis.* 2000;181(3):S462-72.
183. Sato K, Okajima F. Role of sphingosine 1-phosphate in antiatherogenic actions of high-density lipoprotein. *World J Biol Cem.* 2010; 1:327-337.
184. Rose H, Hoy J, Woolley I y col. HIV infection and high density lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis.*2008; 199:79-86.
185. Nicholls, S. J., B. Cutri, S. G. Worthley, P. Kee, K. A. Rye, S. Bao, and P. J. Barter. Impact of short-term administration of high-density lipoproteins and atorvastatin on atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005a, 25: 2416-2421.
186. Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, Bao S, Drummond GR, Rye KA y Barter PJ. Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation.*2005b; 111:1543-1550.

187. Imaizumi S., Grijalva V, Navab M, Van Lenten BJ, Wagner AC, Anantharamiah GM, Fogelman AM y Reddy ST. L-4F differentially alters plasma levels of oxidized fatty acids resulting in more anti-inflammatory HDL in mice. *Drug Metab Lett.* 2010; 4:139-148.
188. Wang DX, Liu H, Yan LR y col. The relationship between serum amyloid A and apolipoprotein A-I in high-density lipoprotein isolated from patients with coronary heart disease. *Chin Med J (Engl).* 2013; 126:3656-3661.
189. Hima Bindu G, Veena S. Rao and Vijay V. Kakkar. Friend turns foe: transformation of anti-inflammatory HDL to proinflammatory HDL during acute-phase response. *Cholesterol.* 2011; 2011:274629.
190. Samikkannu T, Rao KV, Arias AY y col. HIV infection and drugs of abuse: role of acute phase proteins. *J Neuroinflammation.* 2013; 10:113.
191. Tolle M., Huang T, Schuchardt M, Jankowski V, Prufer N, Jankowski J, Tietge UJ, Zidek W y Van der Giet M. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory capacity by accumulation of pro-inflammatory-serum amyloid A. *Cardiovasc Res.* 2012; 94: 154-162.
192. Tselepis AD, John Chapman M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl.* 2002;3:57–68.
193. Serrano-Villar S, Estrada V, Gómez-Garre D, Ávila M, Fuentes-Ferrer M, Sánchez-Parra C, Sainz T, de Carranza M, Fernández-Cruz A. Clinical factors and biomarkers associated with subclinical atherosclerosis in the human immunodeficiency virus infection. *Med Clínica (Barc.).* 2012a;139:231-237
194. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML y col. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2007; 115:459-467.
195. Malvestutto CD, Aberg JA. Management of dyslipidemia in HIV-infected patients. *Clin Lipidol* 2011;6: 447–462.

196. Gómez-Garre D, Estrada V, Ortega-Hernández A y col. Association of HIV-infection and antirretroviral therapy with levels of endothelial progenitor cells and subclinical atherosclerosis. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012; 61:545-551.
197. Sumi M, Sata M, Miura S, Rye KA, Toya N, Kanaoka Y, Yanaga K, Ohki T, Saku K, Nagai R. Reconstituted high-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27:813–8.
198. Noor R, Shuaib U, Wang CX, Todd K, Ghani U, Schwindt B, Shuaib A. High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis. *Atherosclerosis*. 2007; 192:92–9.
199. Feng Y, Jacobs F, Van Craeyveld E, Brunaud C, Snoeys J, Tjwa M, Van Linthout S, De Geest B. Human ApoA–I transfer attenuates transplant arteriosclerosis via enhanced incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28:278–83.
200. Feng Y, van Eck M, Van Craeyveld E, Jacobs F, Carlier V, Van Linthout S, Erdel M, Tiwa M, De Geest B. Critical role of scavenger receptor-BI-expressing bone marrow-derived endothelial progenitor cells in the attenuation of allograft vasculopathy after human Apo A–I transfer. *Blood*. 2009; 113:755–64.
201. Feng Y, Lievens J, Jacobs F, Hoekstra M, y col. Hepatocyte-specific ABCA1 transfer increases HDL cholesterol but impairs HDL function and accelerates atherosclerosis. *Cardiovascular Research*. 2010; 88:376-385.
202. Coll B, Parra S, Alonso-Villaverde C y col. The role of immunity and inflammation in the progression of atherosclerosis in patients with HIV infection. *Stroke*. 2007;38:2477-2484
203. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145:341 55.
204. Albiero M, Menegazzo L, Avogaro A y col. Pharmacologic targeting of endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*.2010; 10:16–32.

205. Mikirova NA, Casciari JJ, Hunninghake RE y col. Effect of weight reduction on cardiovascular risk factors and CD34-positive cells in circulation. *Int J Med Sci*. 2011;8:445–452.
206. Costiniuk CT, Hibbert BM, Filion LG y col. Circulating endothelial progenitor cell levels are not reduced in HIV-infected men. *J Infect Dis*. 2012; 205:713–717.
207. Briel M, Ferreira-Gonzalez I, You JJ y col. Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. *BMJ*. 2009; 338:b92.
208. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M y col. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011; 364:127-135.
209. Negrodo E, Ribalta J, Ferre R, Salazar J, Rey-Joly C, Sirera G y col. Efavirenz induces a striking and generalized increase of HDL-cholesterol in HIV-infected patients. *AIDS*. 2004; 18:819-21.
210. Shah PK. Residual risk and high-density lipoprotein cholesterol levels: is there a relationship?. *Rev Cardiovasc Med*. 2011; 12:e55-59.
211. Gibellini D, Borderi M, Clò A, Morini S, Miserocchi A, Bon I, Ponti C, Re MC. HIV-related mechanisms in atherosclerosis and cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2013;14(11):780-90.
212. Deschaseaux F, Selmani Z, Falcoz PE y col. Two types of circulating endothelial progenitor cells in patients receiving long term therapy by HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Pharmacol*. 2007; 562: 111–118.
213. Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Anantharamaiah GM y Fogelman AM. The role of dysfunctional HDL in atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*. 2009; 50:S145-S149.
214. Ibáñez B, Giannarelli C, Cimmino G, Santos-Gallego CG, Alique M, Pinero A, Vilahur G, Fuster V, Badimón L, Badimón JJ. Recombinant HDL(Milano) exerts greater anti-inflammatory and plaque stabilizing properties than HDL(wild-type).

Atherosclerosis. 2012; 220:72-7.

215. Yamamoto S, Yancey PG, Ikizler TA, Jerome WG, Kaseda R, Cox B, Bian A, Shintani A, Fogo AB, Linton MF, Fazio S, Kon V. Dysfunctional high-density lipoprotein in patients on chronic hemodialysis. *J Am Coll Cardiol*. 2012; 60:2372-9.
216. Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation*. 2003; 108:661-3.
217. Kelesidis T, Yang OO, Currier JS, Navab K, Fogelman AM, Navab M. HIV-1 infected patients with suppressed plasma viremia on treatment have pro-inflammatory HDL. *Lipids Health Dis*. 2011; 10:35

9. ANEXO

Los resultados presentados en esta tesis han sido publicado en:

Ortega-Hernández A, Góme-Garre D, Serrano-Villar S, Ávila M, Heras M, Masana L, Fernández-Cruz A, Estrada V. High-density lipoprotein (HDL) particle distribution and HDL functionality are impaired and associated to subclinical atherosclerosis in HIV-infected patients. *J. Lipid research*. 2014 (en revisión).

Gómez-Garre D, Estrada V, Ortega-Hernández A, Muñoz-Pacheco P, Serrano-Villar S, Avila M, Fuentes-Ferrer M, Tejerina T, Fernández-Cruz A. "Authors' Reply: Association of HIV-Infection and Antiretroviral Therapy with Levels of Endothelial Progenitor Cells and Subclinical Atherosclerosis". *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013;62:e23-5.

Estrada V, Gómez-Garre M, Ortega-Hernández A, Muñoz-Pacheco P, Serrano-Vilar S, Sainz-Costa T, Carranza M, Rodrigo M, Fernández-Cruz A. "HIV-infected patients show functionally defective high-density lipoprotein (HDL) paralleled with changes in HDL-associated proteins". *J Int AIDS Soc* 2012;15:18271.

Dulcenombre Gómez-Garre, Vicente Estrada, Adriana Ortega-Hernández, Paloma Muñoz-Pacheco, Sergio Serrano-Villar, Mario Ávila, Manuel Fuentes-Ferrer, Teresa Tejerina, MD, and Arturo Fernández-Cruz. "Association of HIV-Infection and Antiretroviral Therapy with levels of endothelial Progenitor Cells and Subclinical Atherosclerosis". *J Acquir Immune Defic Syndr* . 2012. 61(5):545-51.

Los resultados de esta tesis han sido parcialmente presentados en las siguientes reuniones científicas:

"Estudio de la funcionalidad de las partículas HDL y su relación con el riesgo de enfermedad cardiovascular en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humano (VIH)". Ortega-Hernández A, Estrada V, Serrano Villar S, Ávila M, Heras M, Masana L, Fernández-Cruz A, Gómez-Garre D. 19ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión liga española para la lucha contra la hipertensión arterial. 2014. Madrid.

“Disfuncionalidad de la HDL y su relación con el riesgo de enfermedad cardiovascular en pacientes infectados por el virus del VIH”. Ortega-Hernández A, Estrada V, Serrano Villar S, Ávila M, Heras M, Masana L, Fernández-Cruz A, Gómez-Garre D. 27 Congreso Nacional de la sociedad española de aterosclerosis. 2014. Barcelona (premiado).

“Estudio de la distribución y las propiedades anti-inflamatorias de las partículas HDL de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)”. Adriana Ortega-Hernández, Dulcenombre Gómez-Garre, Vicente Estrada, Paloma Muñoz-Pacheco, Arturo Fernández-Cruz. 25 Congreso Nacional de la sociedad española de aterosclerosis. Junio 2012. Reus.

“Células progenitoras endoteliales circulantes y arteriosclerosis en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)”. A. Ortega Hernández, D. Gómez Garre, P. Muñoz Pacheco, M. Ávila, A. Barbero, S. Serrano Villar, V. Estrada Pérez, A. Fernández-Cruz. 16ª reunión nacional sociedad española de hipertensión liga española para la lucha contra la hipertensión arterial; Barcelona, 2011 (póster) publicado en Hipertensión 2010;27:7.

“Niveles de células progenitoras endoteliales circulantes en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)”. A. Ortega Hernández, D. Gómez Garre, S. Serrano Villar, Teresa Tejerina Sánchez, V. Estrada Pérez, A. Fernández-Cruz. Congreso de las enfermedades Cardiovasculares SEC 2010; Valencia, 2010 (póster) publicado en Rev Esp Cardiol. 2010; 63 Supl. 3:1-217.