



**INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA  
IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT**  
**Gerard Aragonès Bargalló**

Dipòsit Legal: T. 1353-2011

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

Gerard Aragonès Bargalló

**INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE  
LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE  
LES LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT**

**TESI DOCTORAL**

dirigida pel

Dr. Carlos Alonso-Villaverde Lozano

Dr. Jorge Joven Maried

Departament de Medicina i Cirurgia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus

2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT  
DEPARTAMENT DE MEDICINA I CIRURGIA

Carrer Sant Llorenç, 21  
43201 Reus  
Tel. 977 759 306  
Fax. 977 759352

FEM CONSTAR que aquest treball, titulat "Inflamació i oxidació en la infecció pel virus de la immunodeficiència humana: modificacions de les lipoproteïnes d'alta densitat", que presenta Gerard Aragonès Bargalló, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Centre de Recerca Biomèdica de l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili i que aconsegueix els requeriments per poder optar al títol de Doctor.

Reus, 10 d'abril de 2011

El director de la tesi doctoral

El codirector de la tesi doctoral

Dr. Carlos Alonso-Villaverde Lozano

Dr. Jorge Joven Maried

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

*“To wrest from nature the secrets which have perplexed philosophers in  
all ages, to track to their sources the causes of disease, to correlate  
the vast stores of knowledge that may be quickly available for the  
prevention and cure of disease... these are our ambitions”*

***En la memòria de Victor A. McKusick (1921-2008)***



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

## AGRAÏMENTS

Poques vegades tenim l'oportunitat d'expressar i agrair tot allò que sentim. En breus paraules m'agradaria dirigir-me a tots vosaltres, que durant aquests cinc anys m'heu acompanyat en aquesta aventura i heu fet possible d'una manera o altra, la realització d'aquesta Tesi Doctoral.

En primer lloc, al Dr. Jorge Joven, el meu mentor i mestre, una persona excepcional i un científic d'un talent inigualable. Gràcies per les teves idees genials, gràcies per tot el què m'has ensenyat, gràcies pel teu entusiasme i, sobretot, per haver cregut en mi. Se n'aprèn, se n'aprèn molt de tu.

Al meu director de Tesi, el Dr. Carlos Alonso-Villaverde, per transmetre'm en tot moment la il·lusió del saber cada dia més, en no desistir mai i seguir sempre endavant, i per tanta i tanta ciència que he après de tu. El teu suport incondicional i les teves paraules m'han acompanyat des del primer a l'últim dia. Moltes gràcies.

Al Dr. Jordi Camps, per donar-me l'oportunitat de compartir al CRB les meves inquietuds científiques i formar-me com a futur investigador. Gràcies per la teva confiança i bon humor.

Als companys del CRB : els que ja s'han doctorat i han iniciat un nova etapa de post-doc lluny d'aquí: Natàlia, Mònica, Fernando, i en especial al Blai, ja que sempre has estat el referent a seguir); a les noves incorporacions del laboratori, a l'Esther, per haver-te adaptat increïblement bé al grup i per la teva predisposició a ajudar, sempre, sense cap problema; i l'Anabel, per donar-me un cop de mà (molts cops de mà) durant aquests últims mesos amb les PONs i els "ahmeds"; i a les tècnics d'anatomia, en especial a l'Alba, pel seu suport i per aquest sentit de l'humor tan peculiar, però sense oblidar-me de la Mònica i l'Esther.

Als qui s'han convertit en amics més que en companys de laboratori, Anna, Raúl i Judith. Gràcies pel vostre enorme suport en els moments difícils, les interessants converses científiques i no científiques, les hores i hores de laboratori i de *play*, pels cafès, els *pàrquings*, pels viatges, els sopars, els riures,... i tantes coses que no podria enumerar. Gràcies per aquesta connexió tant especial que hem establert i per aquest ambient de treball tan càlid que cap de nosaltres tornarà a trobar mai. En resum, hem estat una gran família.

A tots els membres dels Laboratoris Clínics (adjunts, residents, tècnics i secres) per acollir-me i ensenyar-me el dia a dia del treball analític tan valuós que realitzeu i per haver-me ajudat a créixer, tant en el terreny professional com en el científic i personal. Gràcies per confiar en mi. I a l'Ángeles, per les llargues tardes que hem compartit i per aportar sempre tanta alegria.

A la secció de Cardiologia de l'Hospital Sant Joan de Reus, per deixar-me formar part del seu equip i participar en els diferents assaigs clínics que s'estan duent a terme (que no són pocs), i en especial al Txema, per la teva amistat i confiança. El teu suport ha estat imprescindible per tirar endavant aquesta Tesi.

A tot el Servei de Medicina Interna i en especial als membres de la unitat de VIH: Asun, Toñi i Pedro, pel vostre treball excepcional que realitzeu amb aquests malalts. La vostra col·laboració ha estat essencial per a dur a bon port tots els estudis i projectes que hem dissenyat.

A les *biobankers* (Lídia, Carme i Jordina) i totes les *nenes* de la URLA per ser sempre tan benvingut als vostres laboratoris. Sou encantadores.

Als Serveis i Recursos Científic-Tècnics (SiRCT) de la URV, i en especial a la Núria pel teu suport científic desinteressat que m'has donat en tot moment i per tanta *òmica* que he après de tu.

A l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) i al seu director, el Dr. Vidal, i en especial a la Neus, Rebeca i Elis, per estar sempre al peu del canó i no desistir mai.

A GADIS, per donar-me l'oportunitat de conèixer altres realitats molt allunyades del nostre dia a dia, i en especial a la Laura, Miguel, Mercè, Víctor i Marta per l'amistat, el caliu i les vivències passades.

Als meus amics de tota la vida (Xavi, Mar, Jordi i Joel) i als més recents (Christian i Noema), simplement gràcies, sou genials!

Al Gonzalo, Rosa, Gemma, Sara i Maica, pel vostre suport i confiança, i en especial al Zalo, pels teus consells i suport tècnic en el camp de les noves tecnologies de la informació i la comunicació, imprescindibles per avançar en aquest mil·lenni.

A la meva família, especialment als meus pares, que m'ho han donat tot. M'han ensenyat els valors més importants a seguir, m'han acompanyat sempre en els moments més bonics i més difícils d'aquest camí, els seus consells dia a dia, el seu optimisme, la seva perseverança, el seu recolzament i la seva confiança en mi.

A la meva germana Gemma, simplement gràcies per ser-hi sempre i pel teu suport incondicional.

I finalment, a la Mònica per la seva infinita paciència i comprensió, pel seu amor, el seu calor i amistat insubstituïbles, pel nostre dolç dia a dia, per escollir-me com a company i ser la meva companya escollida, i per voler embarcar-nos junts cap a un emocionant futur comú.

Moltes gràcies a tots.

## Índex

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

<b>1. PRESENTACIÓ I JUSTIFICACIÓ.....</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>7</b>
2.1. ATEROSCLEROSI I MALALTIA CARDIOVASCULAR.....	9
2.1.1. Risc cardiovascular.....	9
2.1.2. Patogènia de l'aterosclerosi.....	11
2.2. ATEROSCLEROSI I INFECCIÓ PEL VIH.....	14
2.2.1. Inflamació.....	14
2.2.2. Disfunció endotelial.....	17
2.2.3. Estrés oxidatiu.....	19
2.2.4. Resposta immunològica activada.....	20
2.2.5. Alteracions lipídiques.....	21
2.3. ATEROSCLEROSI I CO-INFECCIÓ PEL VIRUS DE L' HEPATITIS.....	23
2.4. LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT (HDL) .....	26
2.4.1. Estructura, composició i característiques generals.....	26
2.4.2. Metabolisme.....	28
2.4.3. Activitat biològica.....	29
2.4.3.1. Transport revers de colesterol (TRC).....	29
2.4.3.2. Activitat antioxidant.....	31
2.4.3.3. Activitat antiinflamatòria i manteniment de la funció endotelial.....	31
2.4.3.4. Activitat antiapoptòtica.....	33
2.4.4. HDL no funcionals i pro-inflamatòries.....	33
2.4.4.1. Valoració de la funcionalitat de les partícules HDL.....	34
2.4.4.2. Interacció entre la inflamació sistèmica i les partícules HDL.....	35
2.4.4.3. Modificacions químiques de les partícules HDL.....	38
<b>3. HIPÒTESI I OBJECTIUS.....</b>	<b>43</b>
<b>4. RESULTATS.....</b>	<b>45</b>
ESTUDI 1.....	47
Human immunodeficiency virus-infection induces major changes in high-density lipoprotein particle size distribution and composition: the effect of antiretroviral treatment and disease	

severity. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1147-52.

ESTUDI 2.....	55
Pitfalls in measuring high-density lipoprotein cholesterol concentrations in HIV-infected patients. <i>HIV Med</i> 2010;11:260-265	
ESTUDI 3.....	63
Host-pathogen interactions in the development of metabolic disturbances and atherosclerosis in HIV infection: the role of CCL2 genetic variants. <i>Cytokine</i> 2010;51:251-258.	
<b>5. DISCUSSIÓ GENERAL.....</b>	<b>75</b>
<b>6. CONCLUSIONS FINALS.....</b>	<b>83</b>
<b>7. REFERÈNCIES.....</b>	<b>87</b>
<b>8. ANNEX.....</b>	<b>95</b>
8.1. ANNEX I: Teràpia antiretroviral en la infecció pel VIH.....	97
8.2. ANNEX II: Característiques generals i estructura del VIH.....	105
<b>9. MATERIAL SUPLEMENTARI.....</b>	<b>109</b>
Serum paraoxonase-3 concentration in HIV-infected patients. Evidence for a protective role against oxidation and viral infection. <i>Manuscrit en preparació.....</i>	
	111
Pro-inflammatory high-density lipoprotein in HIV-infection: The role of serum amyloid A protein. <i>Manuscrit en preparació.....</i>	
	129

# 1. Presentació i Justificació



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

La Tesi Doctoral, que us presentem, s'ha realitzat al Centre de Recerca Biomèdica de l'Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili ubicat a l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus i ha estat dirigida a la vegada pel Dr. Carlos Alonso-Villaverde (Cap de servei de Medicina Interna de l'Hospital Son Llàtzer de Palma i Professor Assimilat de la Universitat Rovira i Virgili) i pel Dr. Jorge Joven (Cap de Servei dels Laboratoris Clínics de l'Hospital Sant Joan de Reus, Director del Centre de Recerca Biomèdica i Professor Titular de la Universitat Rovira i Virgili).

Un dels principals objectius del nostre grup de recerca a gran escala, és contribuir a la reducció de la morbiditat i mortalitat cardiovascular. Actualment, les malalties cardiovasculars són la primera causa de mortalitat a Catalunya, i a la resta del món industrialitzat. Les prediccions actuals indiquen que, l'any 2020, les malalties cardiovasculars i l'aterosclerosi, en particular, es convertiran en la principal causa mundial de mortalitat. En aquesta Tesi Doctoral hem intentat contribuir, des del context de la infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) i en especial del paper de les lipoproteïnes en el desenvolupament i progressió de l'aterosclerosi, en la lluita pel que s'ha considerat l'epidèmia més important del segle XXI.

En aquest sentit, tot i que el tractament antiretroviral ha disminuït notablement la morbiditat i mortalitat dels pacients infectats pel VIH, les complicacions cardiovasculars són molt freqüents i notablement precoces en aquests pacients. La infecció pel VIH afecta actualment a 33,2 milions de persones arreu del món, i alguns autors han demostrat recentment que, utilitzant tècniques d'exploració ecocardiogràfiques, la incidència d'aterosclerosi subclínica és més gran que l'observada en individus no infectats, tot i ser més joves i tenir similars els altres factors de risc cardiovascular. Així, era d'esperar que el control de la infecció també reduís el risc d'aterosclerosi associat, però els resultats apunten cap el contrari, de manera que les complicacions cardiovasculars s'han convertit en una notable causa de mort o d'incapacitació en aquests pacients. No està clar si aquestes anomalies metabòliques es deuen a la pròpia infecció, o pel contrari, als efectes adversos dels fàrmacs utilitzats, o a la combinació d'ambdós factors. És habitual en estudis comparatius entre diferents fàrmacs antiretrovirals explorar les diferències obtingudes en les concentracions plasmàtiques de colesterol i triglicèrids amb l'esperança de trobar algun avantatge del fàrmac estudiat respecte als factors de risc cardiovascular establerts. Tot i així, aquests factors de risc no semblen explicar l'augment en la incidència d'arteriosclerosi en aquests pacients.

Dins d'un paradigma més recent, i que s'està imposant, altres factors, com els relacionats amb la capacitat oxidant i inflamatòria, sembla que podrien jugar un paper central, especialment, en aquests pacients sotmesos durant tota la vida a un estrès metabòlic crònic. En aquest sentit, les diferents lipoproteïnes plasmàtiques posseeixen diferent acció oxidant, inflamatòria o protectora depenent de la seva composició química. Els estudis publicats sobre la distribució de lipoproteïnes en pacients infectats pel VIH es limiten a aspectes quantitius i no qualitius, i que són, segons la hipòtesi d'aquesta Tesi Doctoral, els veritablement importants. En particular, la concentració plasmàtica de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL, de l'anglès *low-density lipoproteins*) que contenen una sola apolipoproteïna (l'apolipoproteïna B) es troben en relació directa amb els episodis clínics de cardiopatia isquèmica. Són les lipoproteïnes que, al romandre retingudes a la paret arterial, pateixen modificacions químiques que provoquen l'alliberament de radicals lliures i que desencadenen en últim terme la inflamació local i la lesió vascular. En canvi, les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL, de l'anglès *high-density lipoproteins*) són partícules protectores per al desenvolupament de la placa d'ateroma, ja que participen en el transport revers de colesterol, protegeixen o eviten l'oxidació dels lípids i tenen capacitat antiinflamatòria, antiapoptòtica i antitrombòtica. Tanmateix, en certes situacions d'estrès metabòlic, com les que s'observen en pacients infectats pel VIH, es converteixen en lipoproteïnes poc o gens funcionals, perdent les propietats ateroprotectors associades al transport revers del colesterol, i a les seves funcions antioxidants i antiinflamatòries.

En resum, tot indica que les HDL tenen un efecte multifuncional dirigit a evitar la formació de cèl·lules escumoses i per tant a reduir o prevenir l'aterosclerosi. Tot i així, aquest efecte depèn que es conservi la composició adequada, ja que es tracta d'una partícula "*camaleònica*", com l'ha descrit algun autor, amb una doble cara. Un estímul tan advers com és la infecció pel VIH provoca que un element protector, especialment dissenyat per mantenir estable els efectes perniciosos de la inflamació i oxidació, es converteixi en un element distorsionant i afavoridor d'aquests efectes adversos. Coneixent els mecanismes que provoquen aquest canvi, pot dissenyar-se una estratègia de tractament eficaç i elegant. Per tant, creiem justificat que aquesta Tesi Doctoral pretengui profunditzar en l'estudi dels canvis de composició i tamany i de les partícules HDL com a resultat dels greus trastorns inflamatoris associats a la infecció pel VIH, i determinar la seva implicació en la severitat de la infecció i en el desenvolupament de l'aterosclerosi, amb la finalitat de dissenyar noves estratègies terapèutiques adequades.

La tesi està dividida en diferents apartats. La *Introducció* que proporciona els coneixements genèrics necessaris per poder entendre el curs del treball. A continuació, la *Hipòtesi* i els *Objectius* que justifiquen els estudis realitzats en la tesi. Tot seguit, els *Resultats* de la tesi, els quals es presenten a través de tres manuscrits diferents que han estat publicats en revistes científiques d'àmbit internacional (*Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *HIV Medicine* i *Cytokine*). Després, una *Discussió General*, les *Conclusions Finals* de la Tesi i les *Referències* de tota la bibliografia consultada. Finalment els *Annexos*, que amplien la informació referent a la infecció pel VIH amb dues monografies actualitzades sobre *el tractament antiretroviral* i les *característiques generals i estructura del VIH*, i per últim s'inclou un apartat de *Material Suplementari*, en el qual hi hem afegit aquells resultats estretament lligats amb la hipòtesi d'aquesta Tesi Doctoral que encara no han estat publicats i es troben en fase de preparació per a la seva publicació.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

## **2. Introducció**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

## **2.1. ATEROSCLEROSI I MALALTIA CARDIOVASCULAR**

L'aterosclerosi és un procés patològic de caràcter inflamatori, que afecta a les artèries i és la principal causa de les malalties cardiovasculars [1]. Els estudis epidemiològics han revelat que l'aterosclerosi és una malaltia progressiva i multifactorial [2], resultat de diversos factors ambientals i genètics. Es caracteritza, a grans trets, per un engruiximent i pèrdua d'elasticitat de la paret dels vasos sanguinis com a conseqüència de l'acumulació a l'espai subendotelial de material lipídic, teixit fibrós, i restes de tipus cel·lulars i altres productes sanguinis. L'evolució d'aquestes lesions pot donar lloc a l'oclusió de la llum vascular, provocat pel creixement de la pròpia lesió subendotelial o mitjançant complicacions trombotiques, que es desencadenen en l'aparició de manifestacions clíniques com la malaltia isquèmica cardíaca o els accidents vasculars cerebrals [3]. Aquestes complicacions representen la major causa de mort als països desenvolupats. Concretament, a Espanya, 125.000 morts anuals es deuen a l'aterosclerosi, 5 milions de persones ingressen a l'hospital a causa de la malaltia i més de 560.000 pacients són donats d'alta de l'hospital amb el diagnòstic de patir malaltia cardiovascular [4]. Les prediccions actuals indiquen que l'any 2020 les malalties cardiovasculars i l'aterosclerosi, en particular, es convertiran en la principal causa mundial de mortalitat. Tots dos, l'envelliment progressiu de la població del món i un estil de vida poc saludable, hauran contribuït a aquest procés. Durant l'última dècada, la disponibilitat de noves eines de recerca, incloent-hi models de ratolins modificats genèticament, ha donat lloc a una millor comprensió dels mecanismes moleculars que connecten els processos inflamatoris i els factors de risc per al desenvolupament de la placa ateroscleròtica [5]. Així, l'aterosclerosi no és simplement una conseqüència inevitable de l'envelliment degeneratiu, sinó una condició inflamatòria crònica que pot ser convertida en un esdeveniment clínic agut per trencament de la placa i la trombosi.

### **2.1.1. Risc cardiovascular**

L'aterosclerosi es desenvolupa d'una manera asimptomàtica durant molts anys com a conseqüència de diferents factors, tant genètics com ambientals, que constitueixen els denominats factors de risc cardiovascular. La identificació d'aquests factors de risc sorgeix de la combinació d'estudis experimentals i de les dades extretes d'estudis epidemiològics transversals i longitudinals realitzats a la població general,



especialment l'estudi Framingham [6] i el projecte europeu SCORE [7]. A partir dels resultats d'aquests estudis s'han establert diferents factors de risc i s'han desenvolupat models matemàtics que permeten calcular el risc cardiovascular individual en un pacient determinat. Els factors de risc cardiovasculars establerts són capaços de predir de forma independent la malaltia cardiovascular, i poden classificar-se com a modificables, i per tant ser susceptibles de prevenció i tractament, i els que no ho són, com per exemple l'edat, el sexe del pacient i la seva història familiar (**Taula 1**). Per altra banda, es continuen identificant altres factors de risc cardiovascular, denominats emergents, que podrien explicar per què alguns pacients sense factors de risc tradicionals poden presentar malaltia cardiovascular, inclús en individus molt joves.

**Taula 1.** Principals factors de risc cardiovasculars dependents del pacient

---

#### **Factors de risc cardiovascular establerts**

##### *No modificables*

Antecedents familiars de primer grau de cardiopatia isquèmica precoç  
Edat  
Sexe

##### *Modificables*

Tabaquisme  
Hipertensió arterial  
↑ colesterol-LDL i ↓ colesterol-HDL  
Diabetis mellitus  
Glucosa basal alterada  
Resistència insulínica  
Síndrome metabòlica  
Dieta aterogènica  
↑ PCR  
Microalbuminúria  
Deficiència d'estrògens

#### **Factors de risc cardiovascular emergents**

##### *Lipídics*

↑ triglicèrids  
↑ lipoproteïna (a)  
Partícules LDL denses i petites  
↑ apolipoproteïna B i ↓ apolipoproteïna A-I  
↑ colesterol total/colesterol-HDL

##### *No lipídics*

↑ homocisteïna sèrica  
Disfunció endotelial  
Factors pro-trombòtics  
Altres biomarcadors inflamatoris (IL-6, MCP-1, TNF $\alpha$ )  
Hipogonadisme. Disfunció erèctil.  
↑ GIM carotídia  
Factors genètics no lipídics

---

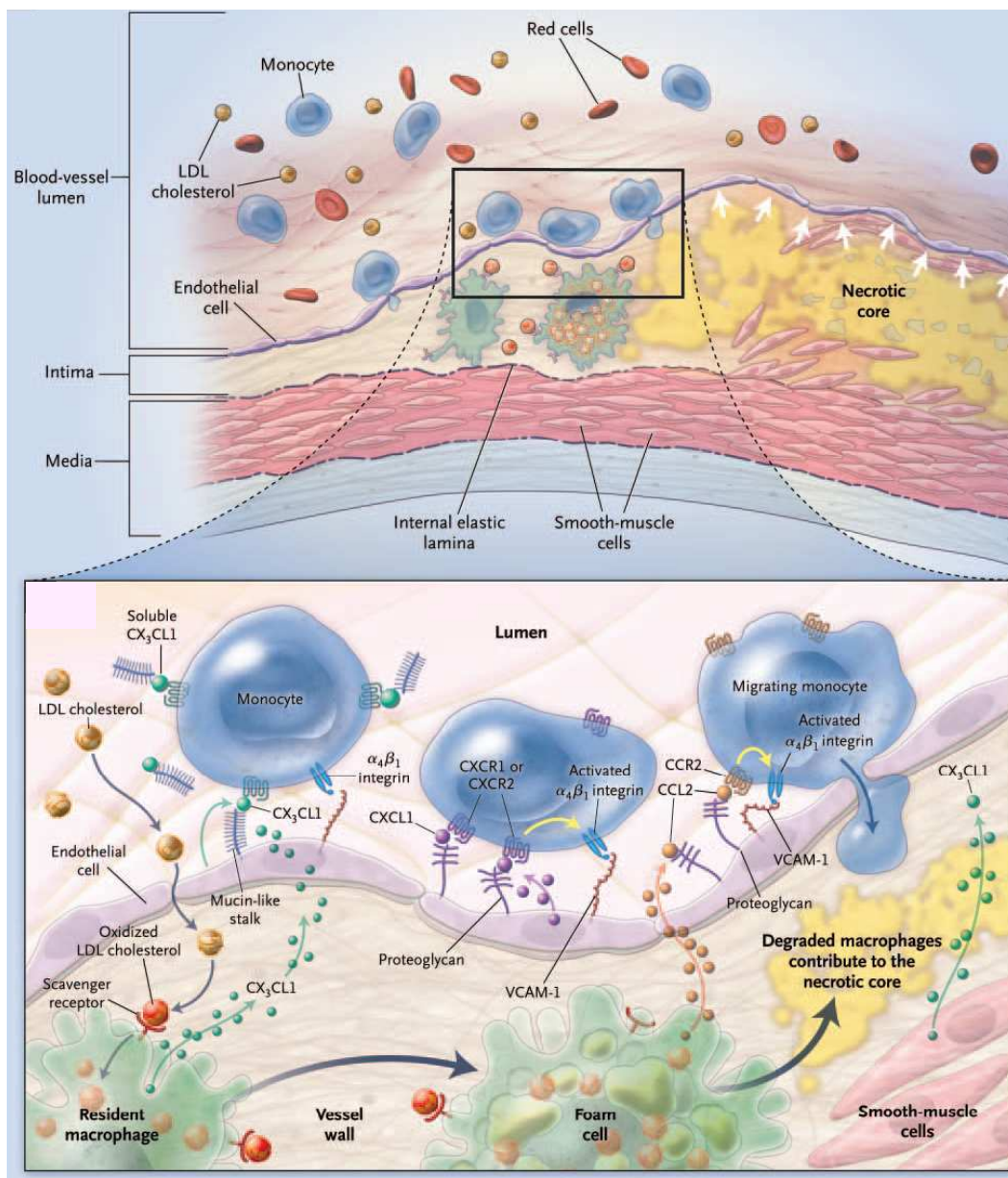
GIM: gruix íntima-mitja; HDL: lipoproteïna d'alta densitat; IL: interleucina; LDL: lipoproteïna de baixa densitat; MCP-1: proteïna quimioatracent de monòcits 1; PCR: proteïna C-reactiva; TNF $\alpha$ : factor de necrosi tumoral alfa

Tot i la importància dels lípids plasmàtics, la formació de la lesió ateroscleròtica és un procés molt més complex, en el qual intervenen l'endoteli vascular, lipoproteïnes modificades, cèl·lules sanguínies com els leucòcits, cèl·lules musculars llises, proteïnes de la matriu extracel·lular i tot tipus de molècules inflamatòries. La percepció de tots aquests fenòmens reforça la idea que la prevenció de les malalties cardiovasculars ha d'implicar no només a la correcció dels factors de risc sinó a desenvolupar noves estratègies per combatre les malalties associades a aquest procés patològic.

### **2.1.2. Patogènia de l'aterosclerosi**

Estudis patològics revelen l'aparició d'una sèrie de canvis en els vasos durant l'aterogènesi i mostren el paper essencial de les cèl·lules inflamatòries, particularment de monòcits/macròfags en la progressió del procés [3]. Estudis amb teixits cel·lulars suggereixen diverses i possibles vies d'iniciació i progressió de la malaltia. Tot i així, la principal evidència és el paper clau que desenvolupa l'endoteli induint la inflamació, l'acumulació de LDL oxidades en l'espai subendotelial, el reclutament de monòcits i la formació de cèl·lules escumoses. La progressió de l'aterosclerosi (**Figura 1**) s'inicia com a resposta a la disfunció endotelial i la inflamació vascular, seguit per la progressiva acumulació de colesterol, calci i restes cel·lulars en l'íntima de la paret vascular de les artèries.

Les primeres lesions consisteixen en l'acumulació subendotelial de colesterol en macròfags i la formació de cèl·lules escumoses. Les cèl·lules endotelials actuen exercint un gran nombre de funcions en l'homeòstasi paret vascular: regulació de la permeabilitat vascular i transport de molècules, que contribueixen al manteniment del to vascular regulant el balanç de molècules vasodilatadores i vasoconstrictores i proporcionen una superfície no adherent pels leucòcits circulants. L'activació i la disfunció endotelial, que apareix en el primer estadi de l'aterogènesi, es caracteritza per l'increment de la permeabilitat vascular en lipoproteïnes, augment del reclutament de leucòcits, reducció de la producció d'òxid nítric i l'augment de la producció de vasoconstrictors, desequilibri de factors protrombòtics i antitrombòtics, provocant un desequilibri en l'homeòstasi de l'endoteli vascular. Entre els agents que medien l'efecte de reclutament de monòcits, trobem les molècules d'adhesió (selectines i integrines) i les molècules quimiotàctiques com la proteïna quimioattractant de monòcits-1 (MCP-1, de l'anglès *monocyte chemoattractant protein-1*), el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) i la interleucina (IL)-6, entre d'altres.



**Figura 1. Desenvolupament de la lesió ateroscleròtica.** La progressió de l'aterosclerosi s'inicia com a resposta a la disfunció endotelial i la inflamació vascular, seguit per la progressiva acumulació de colesterol, calci i restes cel·lulars en l'íntima de la paret vascular de les artèries. Les primeres lesions consisteixen en l'acumulació subendotelial de colesterol en macròfags i la formació de cèl·lules escumoses.

(*N Engl J Med* 2006;354:610-21)

Les selectines (E- i P-selectina) promouen una unió transitòria dels monòcits a l'endoteli anomenada *rolling*, de manera que augmenta el temps de contacte i permet la unió amb la molècula d'adhesió intercel·lular-1 (ICAM-1) i la molècula d'adhesió vascular-1 (VCAM-1) L'augment de permeabilitat vascular dóna lloc a la penetració del subendoteli de LDL circulants, les quals interaccionen amb els proteoglicans de la

matriu subendotelial i n'afavoreix la retenció i els processos de modificació proteolítica i oxidatius, passant a ser altament aterogèniques. L'entrada de colesterol, provinent de les LDL modificades i principalment oxidades al macròfag de forma massiva, té lloc principalment pels *receptors scavenger* (CD36) [7]. Aquest procés dona lloc a la formació de *cèl·lules escumoses*, que en dipositar-se en forma de capes estratificades a l'íntima arterial, es converteix en l'anomenada *estria grassa*. Representa la primera lesió detectable en el procés arterioscleròtic. En els éssers humans, la lesió d'estria grassa es pot trobar en l'aorta en la primera dècada de la vida, en les artèries coronàries en la segona dècada i en les artèries cerebrals en les dècades tercera i quarta. A causa de les diferències en la dinàmica del flux sanguini, existeixen regions que predisposen la formació d'aquestes lesions a les artèries. Les estries grasses no són clínicament significatives, però són les precursors de les lesions més avançades que es caracteritzen per l'acumulació de lípids i restes necròtiques.

Si el procés de proliferació continua, l'estria grassa pot evolucionar cap a una lesió més aguda o *placa d'ateroma*, que conté major riquesa lipídica i restes cel·lulars. A més, les plaques poden arribar a ser cada vegada més complexes amb calcificació, ulceració a la superfície luminal, i presència de lesions hemorràgiques que hi creixen. Encara que les lesions avançades poden produir símptomes d'isquèmia com a resultat d'una progressiva oclusió de la llum vascular, la complicació clínica més important és una ruptura de la placa ateromatosa i la formació d'un trombe o coàgul de sang, donant lloc a un infart de miocardi o accident cerebrovascular [3, 8].

## 2.2. ATEROSCLEROSI I INFECCIÓ PEL VIH

L'aparició d'episodis cardiovasculars en pacients infectats pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) ha anat creixent progressivament des que, degut a la introducció i posterior generalització del tractament antiretroviral combinat o de gran activitat (TARGA), ha disminuït dràsticament la incidència i mortalitat de les malalties definitòries de SIDA i, en contrapartida, han augmentat altres comorbiditats, entre les quals s'inclou l'aterosclerosi i la malaltia cardiovascular. A aquest augment de la incidència de malaltia cardiovascular també hi contribueix substancialment l'envelliment progressiu de la població infectada pel VIH, que, com a conseqüència de l'augment en la supervivència aconseguit pel TARGA, ha comportat un increment dels factors de risc cardiovasculars tradicionals. Així, existeixen nombroses dades que suggereixen que els individus infectats pel VIH presenten una aterogènesi accelerada respecte a la població general. El mecanisme pel qual es produeix la lesió vascular no es coneix amb certesa, però se sospita que poden tenir certa importància diversos factors com el TARGA, el propi VIH i l'estat pro-inflamatori associat a la infecció [10-14].

Durant l'última dècada les alteracions metabòliques associades al TARGA han constituït la principal preocupació dels clínics degut a la seva coneguda vinculació amb el desenvolupament d'episodis cardiovasculars. Tanmateix, diverses dades provinents d'estudis experimentals i observacionals i, sobretot, a les conclusions derivades de l'assaig internacional d'interrupció de tractament (SMART, de l'anglès *Strategies for Management of Anti-Retroviral Therapy*) [13], han reconduït l'atenció des del TARGA cap als efectes de la pròpia infecció no tractada, i que podria augmentar el risc d'aterogènesi per diversos mecanismes (**Taula 2**) [15]. A continuació, es revisen els efectes directes del VIH sobre la paret vascular, així com els efectes indirectes secundaris a la immunoactivació i alteracions lipídiques, i s'analitzen les conseqüències de la replicació del VIH en diferents escenaris (pacients *naïve* i pacients que interrompen el tractament).

### 2.2.1. Inflamació

S'ha demostrat que la inflamació és un factor clau en l'inici, progressió i ruptura de la placa d'ateroma en la població general [16]. S'ha suggerit que l'estat pro-

inflamatori crònic associat a la infecció per diferents virus i bacteris pot contribuir a accelerar el desenvolupament de l'aterosclerosi [17,18]. La infecció pel VIH s'acompanya d'una activació de diverses vies inflamatòries de la paret vascular [19], que condueix a l'alliberament de citocines i quimiocines, i a l'expressió de molècules d'adhesió cel·lular que faciliten l'adherència i transmigració dels leucòcits. S'han trobat concentracions plasmàtiques elevades del factor de necrosi tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) i d'interleucina (IL)-6 en pacients amb infecció pel VIH respecte a individus no infectats, i s'ha descrit una correlació d'ambdues citocines amb la càrrega viral del VIH [20]. Les concentracions de la molècula d'adhesió intercel·lular-1 (ICAM-1), de la molècula d'adhesió vascular (VCAM-1) i del factor von Willerbrand també s'han trobat significativament més elevades en pacients *naïve* amb infecció pel VIH que en no infectats, i s'ha observat una disminució en les seves concentracions plasmàtiques paral·lela al descens de la càrrega viral del VIH en pacients amb TARGA, tant amb pautes amb inhibidors de la proteasa (IP) com amb inhibidors de la transcriptasa inversa no anàleg de nucleòsids (ITINAN) [21] (**Annex I: Teràpia antiretroviral en la infecció pel VIH**).

**Taula 2.** Efectes directes del VIH afavoridors de l'aterogènesi en pacients sense tractament antiretroviral

	Biomarcadors bioquímics	Marcadors d'aterosclerosi
Inflamació	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ IL-6<sup>15,20</sup></li> <li>↑ TNF-<math>\alpha</math><sup>27</sup></li> <li>↑ MCP-1<sup>27,39</sup></li> <li>↑ PCR<sup>40</sup></li> <li>↓ IL-10<sup>11</sup></li> <li>↓ Adiponectina<sup>11</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ GIM d'artèria caròtida<sup>84</sup></li> <li>Correlació inversa entre VDE i càrrega viral de VIH<sup>41,42</sup></li> <li>↓ Elasticitat arterial<sup>85,86</sup></li> </ul>
Disfunció endotelial	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ VCAM-1<sup>11,12,21,26,27,39,43</sup></li> <li>↑ ICAM-1<sup>12,21,40,43</sup></li> <li>↑ Factor von Willebrand<sup>12,21,39</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Calcificació artèria coronària<sup>87</sup></li> </ul>
Estrés oxidatiu	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ 7,8-dihidro-8-oxoguanina en cèl. T CD4+<sup>44</sup></li> <li>↓ Activitat ADN glucosilasa<sup>44</sup></li> <li>↑ Concentració de peròxids<sup>46</sup></li> </ul>	
Coagulació	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Dímer D<sup>15</sup></li> <li>↑ tPAI-1<sup>40</sup></li> <li>↑ t-PA<sup>88</sup></li> </ul>	
Activació immunològica	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Cèl·lules CD8+/HLA-DR+/CD38+<sup>53</sup></li> <li>↑ Expressió receptor TNF-<math>\alpha</math> 2<sup>53</sup></li> </ul>	
Dislipèmia	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Colestero-HDL<sup>54-57</sup></li> <li>↑ Triglicèrids<sup>62</sup></li> </ul>	

GIM: gruix íntima-mitja; ICAM: molècula d'adhesió intracel·lular; IL: interleucina; MCP-1: proteïna quimioatrant de monòcits-1; PCR: proteïna C reactiva; TARGA: tractament antiretroviral de gran activitat; TNF- $\alpha$ : factor de necrosi tumoral alfa; t-PA: activador tissular de plasminogen; tPAI-1: inhibidor de l'activador tissular de plasminogen; VCAM: molècula d'adhesió vascular; VDE: vasodilatació depenent de l'endoteli.



Els mecanismes pels quals el VIH indueix activació inflamatòria a la paret vascular no es troben completament definits. S'ha implicat fonamentalment la proteïna *gp120* de l'embolcall lipídic del VIH i dues proteïnes reguladores, la proteïna inductora de transcripció (*Tat*) i la proteïna *Nef* [19] (**Annex II: Característiques generals i estructura del VIH**). Estudis *in vitro* han demostrat que *Tat* indueix la producció de TNF- $\alpha$  en monòcits, TNF- $\beta$  en monòcits, limfòcits T i cèl·lules epitelials [22], i de factor nuclear de cadenes lleugeres kappa potenciador de cèl·lules B activades (NF- $\kappa$ B) i IL-6 en cèl·lules limfoblàstiques i epitelials [23]. La proteïna *Nef* indueix l'alliberament de diverses quimiocines des de monòcits i macròfags com les proteïnes inflamatòries macrofàgiques 1-alfa i beta, IL-6, IL-1b i TNF- $\alpha$  [24,25]. La glicoproteïna de l'embolcall lipídic *gp120* indueix la interacció pro-adhesiva entre les cèl·lules CD4+ i els receptors CXCR4, i l'endoteli vascular, fet que també afavoreix el procés inflamatori [26].

La importància de la replicació del VIH sobre el risc cardiovascular s'ha posat de manifest en els estudis d'interrupció del tractament, fonamentalment en l'estudi SMART. Aquest assaig clínic ha demostrat que la interrupció del TARGA s'associa amb un major risc de mortalitat, i molt específicament, de mortalitat per causes cardiovasculars [13]. Els efectes deleteris del tractament intermitent s'han associat amb la duració de la replicació viral no controlada. Concretament, en un subestudi de l'assaig SMART, en el que es varen comparar diferents biomarcadors inflamatoris i pro-trombòtics en pacients que interrompien el tractament respecte als que mantenien un tractament continu [15], les concentracions basals de IL-6, dímer D i proteïna C reactiva (PCR) es van associar significativament amb un risc més elevat de mortalitat. És a dir, els pacients que interrompien el tractament van mostrar un augment en les concentracions de IL-6 i de dímer D d'un 30 i 16%, respectivament, al cap d'un mes, respecte al 0 i 5% en el grup de pacients amb tractament continu. A més a més, aquest increment dels biomarcadors es va correlacionar de forma positiva i significativa amb la càrrega viral del VIH.

Un altre assaig d'interrupció del tractament antiretroviral, l'estudi *Swiss-Thai-Australia Treatment Interruption Trial* (STACATTO) [11], ha demostrat també una associació entre la replicació viral i les concentracions plasmàtiques de marcadors pro i antiinflamatoris. En aquest estudi es va observar una disminució de VCAM-1, P-selectina, leptina i dímer D coincidint amb el començament del TARGA i un augment paral·lel dels marcadors antiinflamatoris adiponectina i IL-10. A les dotze setmanes de la interrupció es va trobar una associació positiva dels valors de VCAM-1 i MCP-1 amb

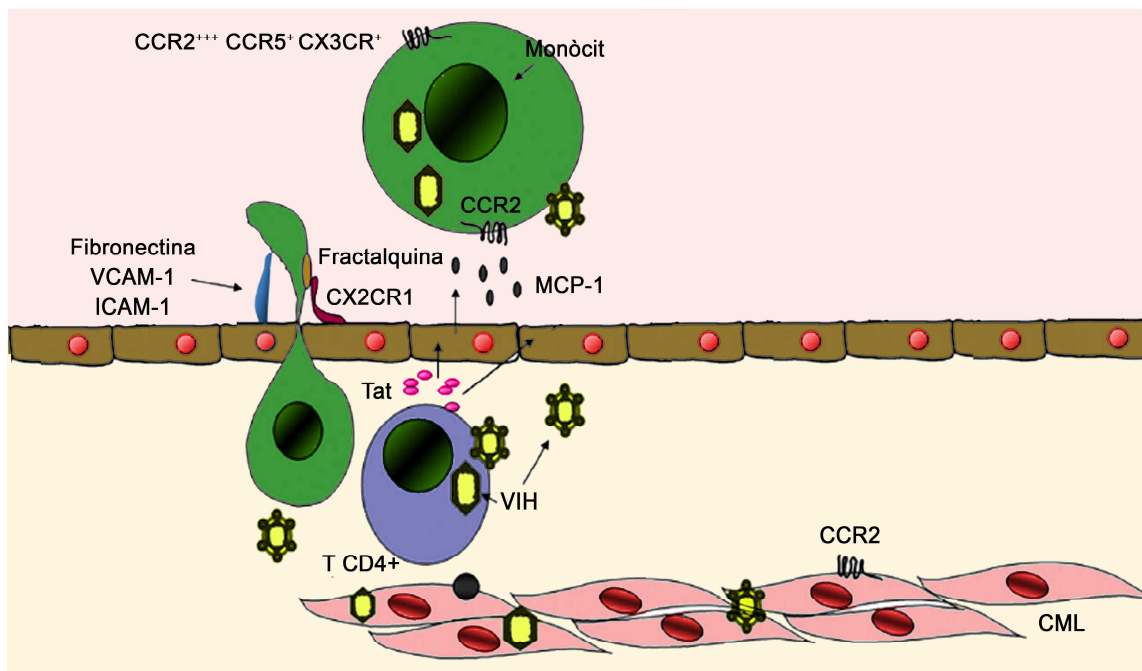
l'increment de la càrrega viral plasmàtica, i negativa de la càrrega viral amb els valors d'adiponectina i IL-10.

Per últim, un subestudi de l'assaig espanyol d'interrupció del tractament antiretroviral STOPAR, que va incloure a 77 pacients, i en el que hi va participar de forma activa membres del nostre grup, també va constatar un augment de les concentracions de MCP-1, IL-6 i VCAM-1, als 24 mesos, en els pacients que interrompien el tractament en relació als individus que es mantenien virològicament suprimits [27].

### **2.2.2. Disfunció endotelial**

La disfunció endotelial és, juntament amb la inflamació, un element clau en l'aterogènesi i constitueix una de les primeres etapes del seu desenvolupament tal i com s'ha dit anteriorment [28]. Existeix una relació estreta entre la disfunció endotelial i la inflamació, de manera que diverses citocines i quimiocines indueixen l'activació endotelial i n'alteren la vasodilatació depenent de l'endoteli [29]. Diversos estudis suggereixen que la infecció pel VIH *per se* pot produir una disfunció endotelial. Un estudi recent ha demostrat que el VIH és capaç d'infectar cèl·lules musculars llises arterials *in vitro* i *in vivo*, produint un fenomen inflamatori local amb alliberament de citocines pro-inflamatòries i disfunció endotelial que podria contribuir directament al desenvolupament d'aterosclerosi [30]. Altres estudis han demostrat l'efecte nociu produït pel VIH o les seves proteïnes en cèl·lules endotelials en cultiu; en concret, la proteïna reguladora *Tat* indueix un augment de la permeabilitat i l'apoptosi de les cèl·lules endotelials [31,32], aquesta última també causada per la glicoproteïna de l'embolcall lipídic *gp120* [33,34]. S'ha descrit que l'expressió de citocines induïda per les proteïnes virals *Tat* i *gp120* afavoreix l'activació de les cèl·lules endotelials a través d'un augment de l'expressió d'E-selectina, VCAM-1 i ICAM-1 [35-37] (**Figura 2**). En aquest sentit, l'administració de salsalat, un antiinflamatori que inhibeix al NF-kB (factor de transcripció ubic que controla l'expressió de gens implicats en la resposta immunitària, apoptosi i cicle cel·lular), millora la vasodilatació depenent de l'endoteli en pacients infectats pel VIH en un petit estudi pilot [38], fet que corrobora el paper de la inflamació i les citocines pro-inflamatòries en la disfunció endotelial associada al VIH.





**Figura 2. Infiltració de monòcits i limfòcits T CD4+ a l'espai endotelial.** En el procés inicial, la infiltració leucocitària de l'espai subendotelial en els pacients infectats pel VIH destaca per algunes particularitats pròpies de la infecció pel VIH. Els limfòcits infectats tenen una major capacitat de penetrar a l'espai subendotelial que els no infectats. Aquest fet podria estar facilitat per un augment de la permeabilitat de l'endoteli vascular induït per la proteïna viral *Tat*. Una vegada instal·lat a l'espai subendotelial, el limfòcit entra en contacte amb les cèl·lules endotelials induint un augment significatiu de la replicació viral, i per tant, un augment de l'expressió de proteïnes virals en l'espai subendotelial. *In vitro*, les cèl·lules endotelials incubades amb *Tat* mostren una expressió augmentada de citocines atraients de macròfags, en especial de MCP-1 i un augment de molècules d'adhesió (VCAM-1 i ICAM-1) per tal d'atraure monòcits a la paret arterial, adherir-los i facilitar la seva penetració a l'espai subendotelial mitjançant proteïnes com la fibronectina. Els monòcits que tendeixen a penetrar a l'espai subendotelial es caracteritzen per expressar un fenotip particular, caracteritzat per una gran quantitat de receptors CCR2 a la seva superfície, en canvi presenten molt poca quantitat de CCR5 i de CX3CR1. Per últim, cal destacar que la infecció de la paret arterial no únicament es localitza a l'espai subendotelial, sinó que també afecta a les cèl·lules musculars llises (CML) arterials. Les CML són infectades pel VIH, i també expressen de forma important a la seva membrana cel·lular, el receptor CCR2.

(Adaptat de *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009;27:33-39)

D'altra banda, diferents estudis clínics han posat de manifest la importància del virus del VIH en el desenvolupament de disfunció endotelial. Ross *et al.* [12] han descrit una elevació dels paràmetres bioquímics de disfunció endotelial i inflamació en una petita cohort de pacients *naïve* respecte a un grup d'individus virològicament controlats sota tractament antiretroviral i un grup de controls no infectats. En un estudi

retrospectiu en el que s'han comparat 56 pacients *naïve* amb 28 pacients no infectats aparellats per edat i sexe, els valors de E-selectina, VCAM-1, MCP-1 i factor von Willebrand han estat significativament més alts en els pacients infectats pel VIH [39]. Un altre estudi similar que comparava 115 pacients *naïve* amb 30 individus no infectats també ha mostrat valors més alts de ICAM-1, de l'inhibidor de l'activador tissular de plasminogen (tPAI-1) i de la PCR en els primers [40]. En ambdós estudis s'ha demostrat una disminució dels marcadors de disfunció endotelial i la PCR un cop iniciat el TARGA, sense variacions en les concentracions de tPAI-1. Aquest descens de marcadors d'activació endotelial després de l'inici del TARGA també s'ha descrit en altres estudis [21,41]. Probablement, un dels estudis més importants sobre els efectes del TARGA en la funció endotelial és el *AIDS Clinical Trial Group (ACTG) 5152*, un subestudi del ACTG 5142, en el que s'ha avaluat la vasodilatació depenent de l'endoteli en pacients *naïve* que iniciaven una pauta antiretroviral sense IP (n=23), sense ITINAN (n=31) i sense inhibidors de la transcriptasa inversa anàleg de nucleòsids (ITIAN) (n=28). En aquest estudi s'ha confirmat una millora de la funció endotelial respecte als valors basals en tots els grups de tractament a les setmanes 4 i 24, independentment de la pauta utilitzada, i una correlació inversa entre el descens de la càrrega viral del VIH i la vasodilatació depenent de l'endoteli [42]. D'altra banda, com ja s'ha comentat anteriorment, els estudis d'interrupció del tractament també han descrit un increment dels marcadors d'activació endotelial VCAM-1 [2,19,43] i ICAM-1 [43] en el grup de pacients que interrompia el TARGA i una associació positiva entre els valors de VCAM-1 i la càrrega viral del VIH [11].

### 2.2.3. Estrés oxidatiu

L'estrés oxidatiu juga un paper clau en la patogènesi de l'aterosclerosi en la població general. L'estrés oxidatiu es produeix com a conseqüència d'un desequilibri entre la producció i la neutralització d'elements pro-oxidants, sobretot radicals lliures i molècules de nitrogen, amb el consegüent dany oxidatiu a proteïnes, lípids i àcids nucleics. Varis estudis han demostrat uns valors d'estrés oxidatiu augmentat en pacients amb infecció pel VIH [44,45], les conseqüències del qual a llarg termini, inclòs el seu paper en el desenvolupament prematur d'arteriosclerosi, es troben actualment en fase d'investigació. Un estudi transversal en pacients amb infecció pel VIH ha demostrat una associació de la concentració total de peròxids, marcador de l'estrés oxidatiu, amb alguns factors de risc cardiovasculars, com el colesterol-LDL i la PCR

[46]. També s'ha descrit que en pacients infectats pel VIH un descens de l'activitat de l'enzim paraoxonasa (PON-1), proteïna vehiculitzada per les partícules HDL capaç d'inhibir la peroxidació lipídica [47]. En la patogènesi de l'estat pro-oxidatiu d'aquest pacients de nou s'ha implicat tant al propi virus com al TARGA. El VIH indueix estrés oxidatiu i depleció de l'òxid nítric a nivell vascular en models animals [48]. *In vitro* s'ha demostrat una inhibició de la síntesi de l'enzim superòxid dismutasa en cèl·lules Jurkat i HeLa per part de la proteïna *Tat* del VIH, el que podria explicar el seu efecte oxidant [49]. Tot i que en alguns estudis clínics s'ha associat el TARGA, especialment els IP, amb l'estrés oxidatiu, altres estudis han demostrat un paper protector del TARGA [44] o de determinats fàrmacs antiretrovirals, com els ITINAN [46], el que confirmaria l'efecte pro-oxidatiu del virus.

#### **2.2.4. Resposta immune activada**

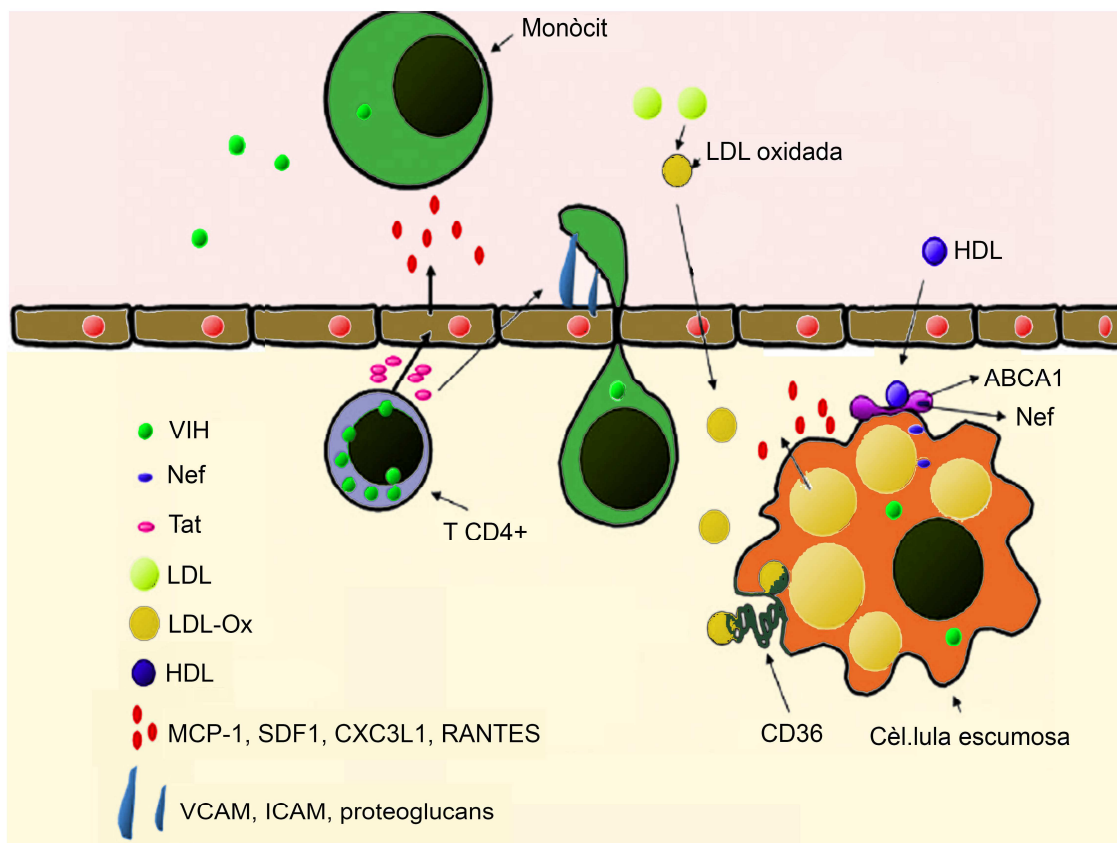
La infecció pel VIH es caracteritza per un estat pro-inflamatori o d'activació immunològica contínua caracteritzat per un augment en el recanvi de limfòcits B i T i cèl·lules *natural killer*, valors elevats de citocines pro-inflamatòries com la IL-6, IL-7 i TNF- $\alpha$  [50] i una elevació de cèl·lules T CD8+ activades amb el fenotip DR+/CD38+, que es considera un marcador de progressió [51]. El TARGA plenament supressor de la replicació viral és capaç de revertir moltes d'aquestes anomalies [21]. De nou, els estudis d'interrupció del tractament antiretroviral ha proporcionat un escenari per l'estudi de les interrelacions entre el virus, l'activació immunològica i els biomarcadors inflamatoris. S'ha suggerit que l'activació immunològica deguda al rebot viral després de la interrupció del tractament antiretroviral podria tenir un paper important en l'augment dels episodis cardiovasculars observats en l'assaig SMART [52]. En l'estudi ACTG 5102 s'ha observat un increment significatiu del marcadors d'activació immunològica, com les cèl·lules CD8+/HLA-DR+/CD38+ i del receptor TNF- $\alpha$  2, en 47 pacients que van interrompre el tractament, coincidint amb el rebot de virèmia [53]. Aquest canvi brusc cap un estat més pro-inflamatori produït per la reactivació de la replicació viral podria induir un augment de l'adhesió plaquetària i la migració de cèl·lules inflamatòries i, per tant, la formació d'una placa inestable [53], el que incrementaria el risc d'episodi cardiovascular.

### 2.2.5. Alteracions lipídiques

Un altre dels mecanismes a través del qual el VIH podria induir malaltia cardiovascular és a través del seu efecte sobre els lípids i lipoproteïnes plasmàtiques. En varis estudis s'han trobat valors baixos de colesterol-HDL en pacients infectats pel VIH [54-57]. Entre els mecanismes proposats fins al moment per explicar l'efecte del virus sobre les partícules HDL, s'ha postulat que els macròfags infectats pel VIH es transformarien en cèl·lules escumoses per acumulació de lípids a través de la inhibició de la bomba d'*eflux* de colesterol produïda per la proteïna *Nef* del VIH [56] (**Figura 3**). Un altre possible mecanisme implicat és l'augment de l'activitat de la *proteïna transferidora d'èsters de colesterol* (CEPT), que, sobretot en presència d'hipertrigliceridèmia, augmenta la transferència dels èsters de colesterol des de les partícules HDL a les lipoproteïnes que contenen apolipoproteïna (apo) B, el que fa disminuir els valors de colesterol associats a les partícules HDL [56].

L'efecte directe del virus en les partícules HDL també s'ha posat de manifest en l'assaig SMART, en el qual el braç d'interrupció del tractament va experimentar un descens significativament superior als valors de colesterol-HDL respecte el grup de pacients amb tractament continu [58]. Els valors disminuïts del colesterol-HDL són un factor de risc independent de malaltia coronària ben conegut en la població general [59]. La importància del colesterol-HDL en pacients infectats pel VIH també ha quedat reflectit en una subanàlisi de casos i controls, que va incloure 248 pacients amb episodis cardiovasculars (infart de miocardi fatal i no fatal, ictus, malaltia arterial perifèrica i insuficiència cardíaca congestiva) i 480 controls, i on es va concloure que el colesterol-HDL és la única lipoproteïna significativament associada als episodis cardiovasculars després d'ajustar el model per les diferents variables demogràfiques, estatus del VIH, altres factors de risc cardiovascular i biomarcadors d'inflamació i coagulació [60]. En un estudi espanyol d'interrupció, que incloïa 37 pacients, també s'ha demostrat una disminució del colesterol total i les apolipoproteïnes A-I i B, amb augment en la relació apo A-I/apo B, el que suposa un perfil més aterogènic [61].

Una altra de les alteracions lipídiques típicament induïda pel VIH és la hipertrigliceridèmia, ben descrita abans de la introducció del tractament amb IP en pacients amb infecció pel VIH i que s'ha associat amb un increment dels valors plasmàtics d'interferó gamma [62].



**Figura 3. Formació de cèl·lules escumoses a l'espai subendotelial.** Una vegada s'han instal·lat els macròfags a l'espai subendotelial expressen un receptor que s'encarregarà de captar lipoproteïnes modificades: *scavenger receptor* o CD36, l'expressió del qual augmenta en presència d'inhibidors de la proteasa (IP). En aquest punt, el macròfag comença a fagocitar àvidament lipoproteïnes modificades acumulant esters de colesterol al seu interior i transformant-se en una cèl·lula escumosa o *foam cell*. Per diversos mecanismes, aquestes cèl·lules moren i els seus dipòsits de colesterol romanen formant el nucli lipídic de la placa. La formació de les cèl·lules escumoses es troba condicionada per la quantitat de lipoproteïnes modificades i la seva penetració a l'espai subendotelial. La modificació de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), en part es deu a la seva taxa catabòlica. Com més temps romanen en circulació més possibilitats tenen de ser modificades. Els IPs inhibeixen l'expressió del receptor de LDL i, per tant, afecten al mecanisme d'eliminació d'aquestes lipoproteïnes. Existeixen diversos mecanismes a través dels quals pot modificar-se una LDL. Poden glicosilar-se en un situació de resistència a la insulina o poden oxidar-se en un desequilibri entre oxidació i antioxidantació. D'altra banda, també s'ha descrit que els pacients infectats pel VIH presenten una disminució de l'activitat de l'enzim paraoxonasa (PON1), proteïna vehiculitzada per les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) i encarregada d'inhibir la peroxidació lipídica. Per últim, cal destacar que el transport revers de colesterol mediat per les HDL hauria de contrarestar aquesta situació captant el colesterol acumulat de les cèl·lules escumoses, però el seu receptor denominat ABCA1, que permet l'*efflux* de colesterol cap a les HDL, es troba inhibit per la proteïna viral *Nef*.

(Adaptat de *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009;27:33-39)

### 2.3. ATEROSCLEROSI I CO-INFECCIÓ PEL VIRUS DE L' HEPATITIS B I C

Com ja hem comentat anteriorment, diversos estudis experimentals i epidemiològics recolzen el paper de les infeccions en el desenvolupament i progressió de l'aterosclerosi [63-66]. Alguns investigadors han analitzat la relació entre els virus de l'hepatitis B (VHB) i C (VHC) i la malaltia ateroscleròtica (**Taula 3**).

**Taula 3.** Resum dels principals estudis que han avaluat la relació entre la infecció pel virus de l'hepatitis B i C i la malaltia ateroscleròtica.

Referències	Virus de l'hepatitis	Disseny de l'estudi	Risc de malaltia ateroscleròtica
Ishizaka <sup>64</sup>	B	Transversal	↑ GIM artèries caròtides
Tong <sup>69</sup>	B	Retrospectiu	↓ Coronariografia
Ghotaslou <sup>66</sup>	B	Retrospectiu	↓ Coronariografia
Sung <sup>70</sup>	B	Longitudinal, prospectiu	↓ IAM, ictus isquèmic
Momiyama <sup>68</sup>	B i C	Transversal	↓ Coronariografia
Volzke <sup>67</sup>	B i C	Transversal	↓ IAM, ictus, GIM artèries caròtides
Ishizaka <sup>71</sup>	C	Transversal	↑ GIM artèries caròtides
Vassalle <sup>73</sup>	C	Transversal	↑ Coronariografia
Alyan <sup>72</sup>	C	Retrospectiu	↑ Coronariografia
Bedimo <sup>74</sup>	C	Retrospectiu	↑ IAM, ictus
Weber <sup>76</sup>	C	Longitudinal, prospectiu	↓ IAM

GIM: gruix íntima-mitja; IAM: infart agut de miocardi

Tot i que un estudi transversal ha associat la infecció pel virus B i la presència de plaques carotídiades en ecografia d'alta resolució, la majoria d'estudis no han trobat una vinculació entre la infecció persistent d'aquest virus i la presència de malaltia cardiovascular [67] o d'aterosclerosi coronària mesurada per coronariografia [68,69]. Únicament, un estudi longitudinal realitzat a Corea ha descrit que l'antigen de superfície del VHB s'associa amb un augment del risc d'ictus hemorràgic en els pacients que presentaven disfunció hepàtica, i amb un menor risc d'ictus isquèmic i infart agut de miocardi en els pacients sense disfunció hepàtica, respecte un grup d'individus control no infectats [70].



Tanmateix, la relació del VHC amb el desenvolupament d'aterosclerosi es controvertida. La presència d'infecció pel VHC avaluada per serologia positiva s'ha associat amb malaltia ateroscleròtica coronària i carotídia en alguns estudis [71-73], però no en d'altres [67,68]. Una anàlisi retrospectiva recent de la cohort de veterans americans, que inclou a més de 20.000 pacients, ha demostrat un augment del risc d'infart de miocardi en pacients amb infecció pel VIH i co-infectats pel VHC, en relació amb pacients no co-infectats, que es va mantenir després d'ajustar pels factors tradicionals de risc cardiovascular (hipertensió arterial, edat, diabetis i tabac), tant abans com després de l'inici TARGA, tot i que en aquest últim cas la diferència en el risc d'infart de miocardi entre mono-infectats i co-infectats no va arribar a la significació estadística [74]. Tanmateix, aquesta associació amb el VHC no s'ha trobat en les anàlisis de la cohort D:A:D, tot i que en aquesta cohort es va detectar una associació entre la co-infecció pel VHC i el desenvolupament de diabetis mellitus (DM) [75].

A més a més de l'associació observada en la cohort D:A:D, hi ha altres estudis epidemiològics que han posat de manifest un major risc de resistència a la insulina i, a la llarga, de DM en pacients amb infecció crònica pel VHC [76-79]. La resistència a la insulina és el principal mecanisme involucrat en el desenvolupament de la síndrome metabòlica, que s'ha descrit fins en un 26% dels pacients amb hepatitis C crònica, sobretot en el genotip 1 [80], i que constitueix una causa important d'augment de la morbimortalitat cardiovascular. Varis mecanisme que actuen de forma simultània podrien contribuir a explicar l'associació entre la resistència a la insulina i el VHC; probablement el triangle inflamació crònica-esteatosis-resistència insulínica i les seves interrelacions tinguin un paper clau. La resistència insulínica s'ha implicat com a factor causal d'esteatosis hepàtica i fibrosi en pacients amb genotip 1 del VHC [77]. El genotip 3 també s'ha associat a esteatosis, però en aquest cas l'esteatosis s'ha relacionat fonamentalment amb la càrrega viral del VHC i no amb la resistència a la insulina [81]. La infecció pel VHC s'acompanya a més a més d'una activació persistent de macròfags i sobreproducció de citocines i quimiocines pro-inflamatòries, el que en presència de valors elevats d'àcids grassos intrahepatocitaris poden alterar les vies intracel·lulars de l'hepatòcit i inhibir el senyal per a la insulina, produint resistència insulínica [79]. La proteïna *core* del virus C pot directament inhibir a la insulina i augmentar la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS), contribuint a exacerbar la resistència insulínica [79]. Per altra banda, la co-infecció pel VHC s'associa a un estat pro-trombòtic amb activació plaquetària i disfunció endotelial que pot augmentar el risc cardiovascular [78]. El tractament amb interferó s'ha associat a una millora en la

resistència insulínica mediada per l'índex HOMA de funció de cèl·lula beta pancreàtica i l'índex de sensibilitat a la insulina en pacients amb una resposta sostinguda al tractament [82] i amb una millora de l'esteatosi hepàtica en pacients infectats amb el genotip 3 del VHC [83].



## 2.4. LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT (HDL)

L'arteriosclerosi és una malaltia multifactorial de la qual s'han determinat múltiples agents associats a la progressió de la malaltia, però molt pocs elements que representin un paper protector. L'apolipoproteïna A-I i les partícules HDL presenten un paper preponderant en l'homeòstasi del colesterol, ja que promouen el pas del colesterol des dels teixits perifèrics fins al fetge per a facilitar la seva excreció. Aquest pot ser el mecanisme a través del qual l'HDL protegeix del desenvolupament de l'arteriosclerosi. En aquest apartat, s'intentarà resumir els aspectes més rellevants del seu metabolisme i les seves implicacions fisiopatològiques i terapèutiques.

### 2.4.1. Estructura, composició i característiques generals

El nom HDL (de l'anglès, *high-density lipoprotein*) implica la utilització d'un criteri de densitat en la classificació de les famílies lipoproteïques i a la vegada, el mètode utilitzat (ultracentrifugació) per a la seva separació respecte altres components del sèrum. Utilitzant la ultracentrifugació s'obtenen les diferents famílies de lipoproteïnes: els quilomicrons, VLDL (*very low-density lipoproteins*), IDL (*intermediate-density lipoprotein*), LDL (*low-density lipoprotein*) i les HDL. Utilitzant com a classificació aquest mateix criteri de densitat, podem distingir dues subpoblacions majoritàries, les HDL<sub>2</sub> (densitat entre 1,063 i 1,125 g/mL) i les HDL<sub>3</sub> (densitat entre 1,125 i 1,210 g/mL) i les pre-β-HDL de més de 1,210 g/mL (**Taula 4**). Una altra classificació divideix les partícules d'HDL en funció del seu contingut apolipoproteic. Les apolipoproteïnes són proteïnes, normalment de composició bastant hidrofòbica, que estableixen l'estructura i confereixen bona part de la funcionalitat a les lipoproteïnes. L'apolipoproteïna A-I (apo A-I) és la proteïna quantitativament més abundant a les HDL, seguida de l'apolipoproteïna A-II (apo A-II). Això, dona lloc al concepte freqüentment utilitzat de partícules HDL amb apo A-I i sense apo A-II, HDL amb apo A-I i apo A-II, i HDL sense apo A-I i amb apo A-II [89]. No s'ha d'oblidar, que aquesta classificació no té en compte el contingut de les HDL en altres apolipoproteïnes minoritàries, com són C-I, C-II, C-III, A-IV, E, D, H i M. Per tant, inclús dins de cadascun d'aquests tipus de partícules existeix una heterogeneïtat apolipoproteica molt important. Una altra classificació, basada en la mobilitat electroforètica en gels d'agarosa, agrupa a les diferents subpoblacions d'HDL segons la seva càrrega elèctrica, i per tant, segons la seva mobilitat com a partícules α, pre-β i

γ. La separació de les HDL segons el seu tamany es pot realitzar utilitzant l'electroforesi en un gel no desnaturalitzant en gradient de poliacrilamida. D'aquesta manera s'obtenen poblacions que, a semblança de les obtingudes per ultracentrifugació, es denominen HDL<sub>3c</sub> (7.6 nm), HDL<sub>3b</sub> (8.0 nm), HDL<sub>3a</sub> (8.4 nm), HDL<sub>2a</sub> (9.2 nm) i HDL<sub>2b</sub> (10.6 nm) [90].

**Taula 4.** Resum de les principals característiques i classificació de les partícules HDL.

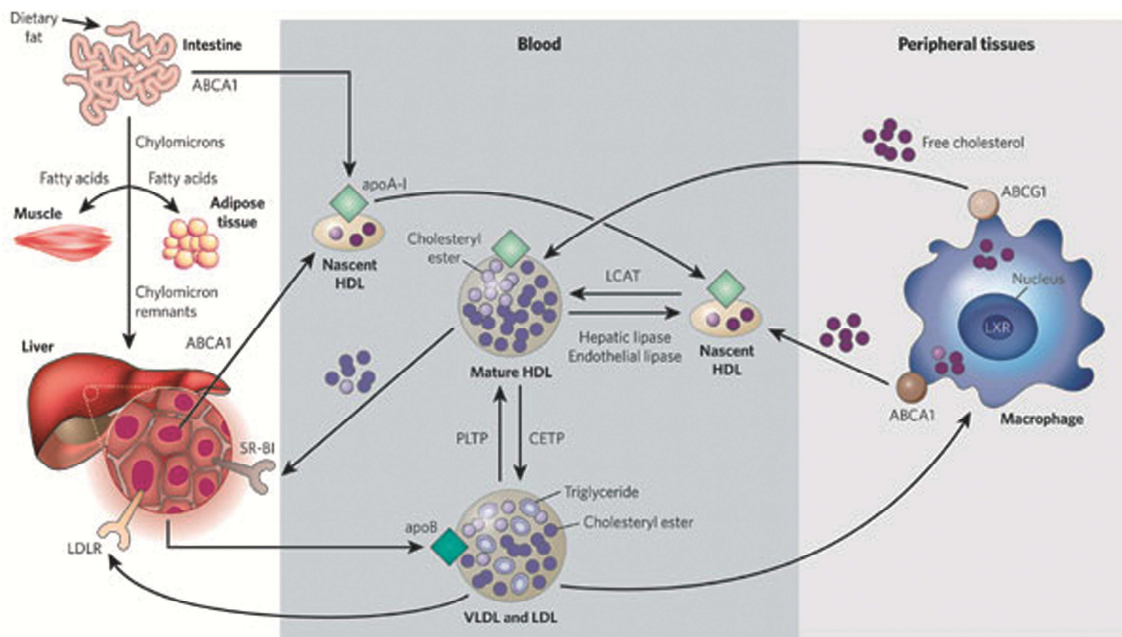
Propietat	Pre-β-HDL	HDL <sub>2</sub>	HDL <sub>3</sub>
Pes molecular (Da)	Pre-β <sub>1</sub> : 71.000 Pre-β <sub>2</sub> : 325.000	360.000	175.000
Mobilitat electroforètica	Pre-β	α	α
Densitat (g/L)	>1,210	1,063-1,125	1,125-1,210
Subpoblacions	Pre-β <sub>1</sub> , Pre-β <sub>2</sub> i Pre-β <sub>3</sub>	HDL <sub>2b</sub> i HDL <sub>2a</sub>	HDL <sub>3a</sub> , HDL <sub>3b</sub> i HDL <sub>3c</sub>
Diàmetre (nm)	Pre-β <sub>1</sub> : 5,4-7 Pre-β <sub>2</sub> : 12-14	HDL <sub>2b</sub> : 9,7-12 HDL <sub>2a</sub> : 8,8-9,7	HDL <sub>3a</sub> : 8,2-8,8 HDL <sub>3b</sub> : 7,8-8,2 HDL <sub>3c</sub> : 7,2-7,8

A més a més de les apolipoproteïnes, en el component proteic de les HDL, trobem enzims que s'associen a la partícula. Entre aquests enzims es troben els que estan associats al metabolisme de les HDL com són la *lecitin-colesterol aciltransferasa* (LCAT), la *proteïna transferidora d'èsters de colesterol* (CEPT) i la *proteïna transferidora de fosfolípids* (PLTP). A més, en aquestes partícules també hi podem trobar associats altres enzims com són la *paraoxonasa-1* (PON1), *paraoxonasa-3* (PON3), *acetilhidrolasa de factor plaquetari* (PAF-AH) i *glutatió selenoperoxidasa plasmàtica* (GPX3). En determinades condicions fisiològiques la composició de les partícules HDL pot variar, com és el cas en la resposta a fase aguda, en la qual apareixen en el plasma proteïnes pro-inflamatòries com són el *sèrum amiloid A* (SAA), la *mieloperoxidasa* (MPO), la *ceruloplasmina* i l'*apolipoproteïna J*, que s'associen a les HDL i poden variar la seva estructura i funcionalitat.

## 2.4.2. Metabolisme

Les partícules HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub> madures procedeixen de partícules precursors lliures d'apo A-I i de partícules pre-β-HDL que són produïdes com a *HDL nascents* pel fetge o intestí, o bé són alliberades per lipòlisi a causa de l'efecte de la *lipoproteïna lipasa* (LPL) sobre lipoproteïnes riques en triglicèrids com les VLDL y els quilomicrons. L'*eflux* de colesterol regulat per la proteïna transferidora de colesterol ABCA1 (*ATP-binding cassette A1*) des de les cèl·lules és important per al procés inicial de lipidació de les HDL, i l'esterificació del colesterol regulat per LCAT provoca que el colesterol passi al nucli de la partícula, generant partícules esfèriques (**Figura 4**). Aquestes partícules continuen creixent per l'acció de la *proteïna transferidora de fosfolípids* (PLTP) que permet la fusió de remanents de superfície, i la LCAT continua esterificant colesterol. En sentit invers les partícules grans HDL<sub>2</sub> són de nou convertides a HDL<sub>3</sub> per varis mecanismes. La *proteïna transferidora d'èsters de colesterol* (CETP) intercanvia èsters de colesterol de les HDL<sub>2</sub> per triglicèrids de les lipoproteïnes amb apo B (VLDL y LDL), i posteriorment la *lipasa hepàtica* (HL) hidrolitza els triglicèrids i fosfolípids de les HDL disminuint-ne el seu diàmetre.

Per altra banda, el *receptor scavenger B-1* (SR-BI) del fetge i teixits esteroidegènics (glàndules renals i gònades) recullen selectivament els èsters de colesterol de les partícules HDL<sub>2</sub>. La interconversió d'HDL<sub>2</sub> en HDL<sub>3</sub> a través de la CEPT i HL, i la conversió d'HDL<sub>3</sub> i HDL<sub>2</sub> mediada per la PLTP, alliberen apo A-I lliure o partícules pobres en lípids. Una part de l'apo A-I lliure pot adquirir lípids i iniciar el cicle de nou a través de l'*eflux* de colesterol mediat per ABCA1, però una part és filtrada a nivell glomerular al ronyó, reabsorbida a nivell tubular pel receptor *cubilina megalina*, i hidrolitzada en les cèl·lules tubulars del ronyó. Els lípids de les HDL són catabolitzats o bé de manera separada de les proteïnes, com és la transferència d'èsters de colesterol a través de la CETP a altres lipoproteïnes, o bé a través de SR-BI a teixits, o bé conjuntament com una partícula. En aquest últim punt s'ha identificat una proteïna a la membrana dels hepatòcits, que uneix apo A-I i permet l'endocitosi de la partícula. Aquesta proteïna ha resultat ser la *cadena beta del complex ATP sintasa* [91], i encara queda per dilucidar el mecanisme i la importància d'aquest component de la cadena interna mitocondrial en el metabolisme de les HDL.



**Figura 4. Vies implicades en el metabolisme de la partícula HDL.** ABCA1: ATP-binding cassette A1; ABCG1: ATP-binding cassette G1; ApoA-I: apolipoproteïna A-I; ApoB: apolipoproteïna B; CEPT: proteïna transferidora d'èsters de colesterol; LCAT: lecitin-colesterol aciltransferasa; LDL: lipoproteïna de baixa densitat; LDLR: receptor per la lipoproteïna de baixa densitat; PLTP: proteïna transferidora de fosfolípids; SR-BI: *receptor scavenger* B-1; VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat.

(*Nature* 2008;451:2904-13)

## 2.4.3. Activitat biològica

### 2.4.3.1 Transport revers de colesterol (TRC)

Fa referència al procés mitjançant el qual el colesterol captat per les partícules HDL de les cèl·lules perifèriques, arriba al fetge i és eliminat per les vies biliars. En els éssers humans aquesta captació hepàtica es realitza fonamentalment a nivell de les VLDL, lipoproteïnes residuals tipus IDL, i LDL. El procés pel qual els èsters de colesterol passen de les HDL al grup de lipoproteïnes que contenen apo B (quilomicrons, VLDL, IDL i LDL) es troba regulat per l'acció de la CEPT. A continuació s'analitzen els tres processos que componen aquest sistema, l'*eflux* de colesterol de les cèl·lules plasmàtiques, l'esterificació del colesterol, i el destí metabòlic dels èsters de colesterol formats.

## **A. Eflux de colesterol**

Existeixen dues teories sobre com es produeix l'*eflux* de colesterol cap a les HDL. Una primera teoria proposa un procés de difusió aquosa en el qual el colesterol no esterificat passa de les membranes cel·lulars als acceptors moleculars com a vesícules de fosfolípids sense proteïnes, cilcodextrines sintètiques, albúmina i HDL tripsinitzada. Aquest procés és lent, receptor-independent, no saturable i té poc efecte sobre els dipòsits de colesterol esterificat intracel·lulars [92]. Aquest procés pot ser bidireccional i l'esterificació del colesterol per la LCAT previndria la redifusió del colesterol des de les HDL fins la membrana plasmàtica, augmentant així, l'*eflux* net del colesterol [93]. Les partícules d'HDL que capten aquest colesterol no tenen cap especificitat característica. L'expressió de SR-B1 incrementa aquest *eflux* de colesterol, facilitant la difusió de la membrana als acceptors plasmàtics.

Una segona teoria, proposa que l'*eflux* del colesterol és receptor-depenent i s'ha descrit com un mecanisme de transport ràpid, específic, unidireccional, saturable, independent de LCAT i que redueix els dipòsits d'èster de colesterol del citosol cel·lular. Aquest *eflux* de colesterol i fosfolípids requereix d'acceptors específics com apolipoproteïnes (apo A-I, apo A-II, apo A-IV, apo E i apo Cs) però especialment a una fracció minoritària de partícules HDL, les pre- $\beta$ -HDL. Aquest tipus de partícules contenen únicament apo A-I i suposen únicament el 5% del total de les HDL. A través de l'estudi de la malaltia de Tangier s'ha descobert que el receptor cel·lular que s'associa a l'apo A-I és l'ABCA1, i potser, a altres membres del grup de proteïnes ABC [94]. Així, l'*eflux* específic implica interaccions amb proteïnes de la membrana plasmàtica, amb generació de senyals intracel·lulars que provoquen la translocació del colesterol del reticle endoplasmàtic, Golgi o endosomes cap a la membrana plasmàtica. S'ha descrit que les HDL són internalitzades pels macròfags en el compartiment endosomal des d'on són resecretades juntament amb els lípids [95]. L'expressió d'ABCA1 en macròfags és un factor important en l'aterogènesi, independentment del colesterol de les HDL, permetent als macròfags eliminar l'excés de colesterol i evitar així que es transformin en cèl·lules escumoses.

Actualment s'accepta que els dos processos poden coexistir, i que en alguns tipus cel·lulars l'*eflux* de colesterol es realitzaria utilitzant els dos sistemes, mentre que en d'altres un dels sistemes d'*eflux* seria el majoritari.

## **B. Esterificació del colesterol**

El procés d'esterificació del colesterol en el plasma es produeix únicament per l'acció de la LCAT. La deficiència completa de LCAT no sembla repercutir de la mateixa manera en tots els teixits de l'organisme. A més a més, existeixen evidències experimentals que indiquen que l'activitat LCAT no és necessària per a què es produeixi el component ràpid i específic de l'*eflux* de colesterol regulat per ABCA1 que va dirigit, en primer lloc, a partícules pre- $\beta$ -HDL. Tot i així, l'activitat LCAT sembla ser necessària per al component més lent i inespecífic de l'*eflux* de colesterol, que va dirigit a les partícules HDL de forma dependent, principalment, de la seva concentració.

## **C. Destí dels èsters de colesterol formats en les HDL**

El destí dels èsters de colesterol formats en les partícules HDL és variat. Els èsters de colesterol poden ser captats de forma específica de les HDL després de la unió d'aquestes al receptor SR-BI al fetge, gònades i glàndules suprarenals, sent aquesta, la via principal de transferència de colesterol al fetge. En aquesta via, recentment, s'ha descrit que la *carboxi-èster lipasa* co-localitza amb el SR-BI i podria actuar hidrolitzant els èsters de colesterol que aquest capta, per a ser incorporats als hepatòcits [96]. Poden ser captats pels teixits juntament amb la totalitat de la partícula HDL, a través del receptor LRP de manera minoritària, especialment en el fetge i ronyó. S'ha identificat la cadena  $\beta$  de la ATP-sintasa [91] com a receptor de l'apo A-I que regula l'endocitosi de la partícula HDL en hepatòcits, encara que de moment es desconeix la rellevància i el mecanisme a través del qual un component del complex de síntesi d'ATP mitocondrial regula la captació d'HDL. Una altra via de catabolisme dels èsters de colesterol és que aquests poden ser transferits per la CETP a partícules que contenen apo B-100, i, més tard, ser captats juntament amb aquestes, per part de les cèl·lules via receptor-dependent (receptor de LDL, receptor VLDL, LRT, etc.)

### **2.4.3.2. Activitat antioxidant**

Un aspecte que està despertant un interès creixent alhora d'explicar la capacitat antiaterogènica de les HDL és la seva capacitat d'inhibir la modificació

oxidativa de les LDL, un fenomen que sembla essencial per a la gènesi de l'aterosclerosi [97,98]. El paper central de les LDL en l'aterogènesi és en part, degut a què a l'entrar a l'espai subendotelial queden retingudes en una matriu complexa de proteoglicans. De fet, la concentració d'apo B que trobem a la paret arterial és el doble de la que trobem en circulació. Contràriament, les partícules HDL no queden retingudes i la concentració d'apo A-I a la paret arterial és únicament d'un 10 al 20% de la circulant [99]. Navab *et al.* han demostrat que les LDL contenen petites quantitats d'hidroperòxids derivats de la via de les lipooxigenases que poden ser potencialment iniciadors de l'oxidació. L'apo A-I és capaç de recollir aquests hidroperòxids de les LDL *in vitro*, i també *in vivo* després de la infusió d'apoA-I a ratolins i humans [100]. Quan les concentracions de lípids oxidats de la LDL excedeix un determinat límit, es formen de manera no enzimàtica fosfolípids oxidats amb propietats pro-inflamatòries [101], derivats de la fosfatidilcolina. Alguns d'aquests lípids amb activitat pro-inflamatòria són el POVPC (1-palmitoil-2-oxovaleroil-sn-glicero-3-fosfocolina), el PGPC (1-palmitoil-2glutaril-sn-glicero-3-fosfocolina) i el PEIPC (1-palmitoil-(5,6-epoxiisoprostano E2)-sn-glicero-3-fosfocolina) [102]. Aquests fosfolípids oxidats en la paret arterial posteriorment iniciaran tota la cascada d'episodis inflamatoris que donaran lloc a la formació de l'estria grassa i a la lesió ateroscleròtica. Les LDL oxidades perden l'afinitat pel receptor de LDL i únicament són eliminades pels receptors *scavenger* dels macròfags. S'ha demostrat que l'HDL és capaç d'extreure i inhibir l'activitat dels lípids oxidats de les LDL, evitar que les cèl·lules de la paret arterial transfereixin més espècies reactives a les LDL retingudes i inactivar els fosfolípids oxidats pro-inflamatoris que s'hagin format [102]. Encara que s'han descrit propietats antioxidant de l'apo A-I i l'apo A-II [103], es creu que almenys una part important de la capacitat antioxidant de les HDL és deguda als enzims que tenen associats. Aquests són capaços de convertir productes dels àcids grassos oxidats amb propietats inflamatores en d'altres que no tenen activitat biològica, com s'ha descrit per a la PON1 i la PAF-AH [104,105], tot i que també s'ha suggerit per a la LCAT [106] i GPX3 [107].

#### **2.4.3.3. Activitat antiinflamatòria i manteniment de la funció endotelial**

Tal i com s'ha explicat anteriorment, l'aterosclerosi és una malaltia inflamatòria crònica caracteritzada per un acumulació de macròfags i limfòcits T en la íntima arterial. Un pas inicial d'aquest procés inflamatori, és l'adhesió de monòcits a cèl·lules



endotelials a través de molècules d'adhesió i quimiotàctiques. Les HDL tenen la capacitat d'inhibir les quimiocines com MCP-1 i IL-6, i molècules d'adhesió ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina expressades per part de les cèl·lules endotelials [99] i mantenir inclús la secreció d'eNOs en situacions d'hipercolesterolèmia [108]. Aquesta capacitat pot tenir potencialment una gran importància com a mecanisme protector de les HDL per tal d'evitar la inflamació i mantenir la funcionalitat de l'endoteli.

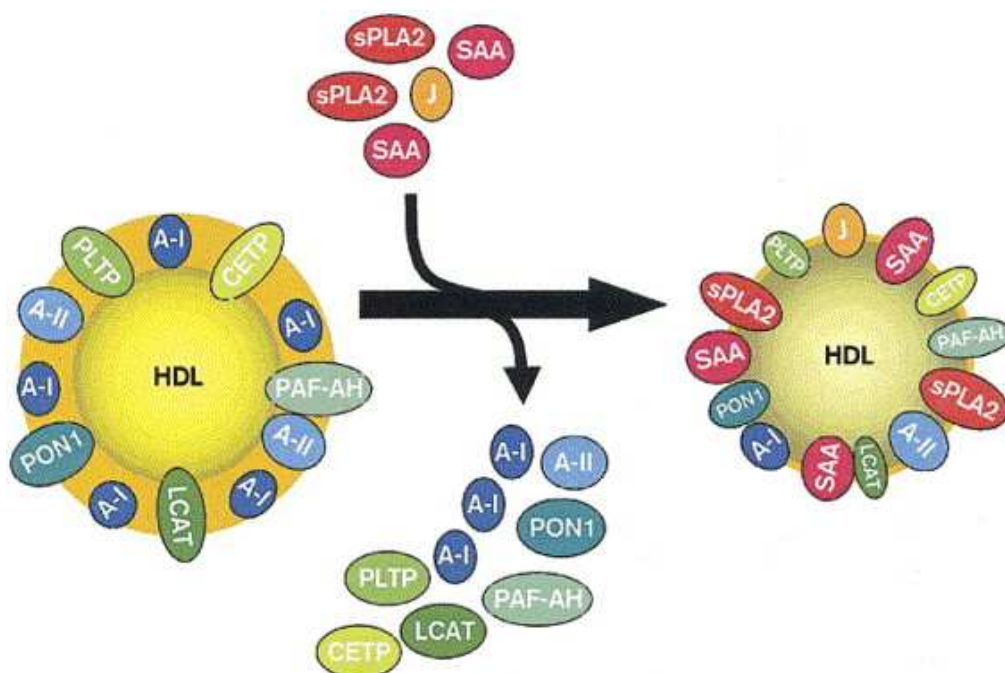
#### 2.4.3.4. Activitat antiapoptòtica

Les partícules HDL potencialment inhibeixen l'apoptosi de les cèl·lules endotelials induïda per LDL oxidades [109] o TNF- $\alpha$  [110]. Aquest efecte és paral·lel a la disminució d'espècies reactives a l'oxigen (ROS) i de les concentracions de marcadors apoptòtics, indicant que pot existir una relació amb la capacitat antioxidant intracel·lular de les partícules d'HDL o dels seus components. A més a més, les partícules HDL contenen lisofosfolípids bioactius, com la *sphingosine-1-phosphate* o S1P (un potent agent antiapoptòtic), el qual podria regular l'efecte antiapoptòtic de l'HDL augmentant la producció de eNOS.

#### 2.4.4. HDL no funcionals i pro-inflamatòries

Tanmateix, a més a més del seu reconegut paper antiaterogènic, les partícules HDL juguen un rol destacat en la immunitat innata. S'ha proposat que les HDL podrien formar part de la resposta sistèmica inflamatòria (resposta a fase aguda), molt conservada evolutivament, per tal de lluitar contra les infeccions. Durant aquesta resposta a fase aguda les partícules HDL podrien modificar significativament la seva composició proteica i lipídica enriquint-se amb reactants de fase aguda (com el sèrum amiloid A o SAA, ceruloplasmina i mieloperoxidasa o MPO), i modificant les concentracions dels enzims antioxidants i el contingut de colesterol (**Figura 5**). Aquestes HDL modificades han estat denominades per alguns autors com a "*HDL disfuncionals*". A més a més, en certes condicions i individus, aquests canvis de composició en les HDL, podrien persistir provocant una cronicitat de la resposta a fase aguda en la qual les partícules HDL no únicament perdrien la seva capacitat antiaterogènica sinó que podrien esdevenir pro-inflamatòries. Aquest fenomen pot suposar un factor de risc que relacioni la inflamació crònica, amb una major susceptibilitat a l'aterogènesi.





**Figura 5. Canvis enzimàtics i proteics a les partícules HDL durant la resposta a fase aguda.** A-I: apolipoproteïna A-I; A-II: apolipoproteïna A-II; CEPT: proteïna transferidora d'èsters de colesterol; LCAT: lecitin-colesterol aciltransferasa; PAF-AH: acetilhidrolasa de factor plaquetari; PLTP: proteïna transferidora de fosfolípids; PON1: paraoxonasa 1; SAA: sèrum amiloid A; sPLA2: fosfolipasa A2 no pancreàtica secretora.

(*Curr Opin Lipidol 2004;15:269-78*)

#### 2.4.4.1. Valoració de la funcionalitat de les partícules HDL

La capacitat antiinflamatòria o pro-inflamatòria de les partícules HDL pot ser caracteritzada utilitzant diversos assaigs *in vitro* que determinen la seva habilitat d'inhibir o limitar la inflamació cel·lular, l'oxidació lipídica, l'*efflux* de colesterol o totes tres a la vegada. Un d'aquests tests és l'assaig de quimiotaxi de monòcits (MCA, de l'anglès *monocyte chemotaxis assay*), el qual quantifica la inhibició de l'activitat quimiotàctica dels monòcits produïda en un model cel·lular de paret vascular, format per un co-cultiu de cèl·lules endotelials aòrtiques i cèl·lules musculars llises, en resposta a la presència de LDL [101]. Així, les partícules HDL amb capacitat antiinflamatòria redueixen la quimiotaxi de monòcits, mentre que les HDL pro-inflamatòries augmenten l'entrada de monòcits al co-cultiu. Inclús, es calcula un índex

inflamatori que representa el quocient de la quimiotaxi de monòcits en presència i absència de partícules HDL; un índex  $> 1,0$  indica que les HDL afavoreixen el procés inflamatori, mentre que un índex  $< 1,0$  indica un efecte antiinflamatori de les HDL. De forma similar, l'assaig fluoromètric lliure de cèl·lules (CFA, de l'anglès *cell-free assay*), determina els canvis en l'oxidació del PGPC (1-palmitoil-2glutaril-sn-glicero-3-fosfocolina) per tal d'avaluar l'efecte protector/inductor de les HDL en presència d'un potent oxidant i utilitzant un marcador fluorescent [111]. Els seus resultats també poden ser indexats basant-se en l'alteració de la senyal fluorescent en funció de l'acció de les HDL. Un tercer assaig *in vitro*, avalua l'impacte de les partícules HDL en l'expressió d'ICAM-1 i VCAM-1 en un cultiu de cèl·lules HUVEC (de l'anglès, *human umbilical vein endothelial cells*) [112]. D'altra banda, també s'han desenvolupat diferents mètodes de laboratori per avaluar l'efecte de les HDL sobre el TRC, incloent els assaigs *in vitro* d'*eflux* de colesterol utilitzant macròfags carregats de colesterol en cultiu, així com determinacions cinètiques i excrecions fecals d'esterols [113].

Cal destacar, que quan els diferents assaigs de valoració de la funcionalitat de les HDL han estat realitzats en les mateixes mostres, els resultats han estat significativament concordants, tot i la variada metodologia utilitzada. Per exemple, els resultats obtinguts en l'assaig MCA és correlacionen positivament amb els resultats obtinguts en el CFA [114], però negativament amb l'assaig d'*eflux* de colesterol [115], indicant que tant l'alteració del TRC com l'augment en la quimiotaxi de monòcits es troben associats amb la presència de lipoproteïnes oxidades i pro-inflamatòries [116,117]. La coincidència de varis aspectes de la funcionalitat de les HLD avaluades individualment, probablement reflecteix les característiques crítiques de la concentració proteica i lipídica de les partícules HDL, així com de les seves activitats enzimàtiques.

#### **2.4.4.2. Interacció entre la inflamació sistèmica i les partícules HDL**

Les HDL poden perdre la seva capacitat protectora i inclús esdevenir pro-inflamatòries en el context d'inflamació sistèmica. Les condicions que han estat associades amb partícules HDL pro-inflamatòries inclouen malaltia coronària arterial [114], síndrome metabòlica [118], malaltia renal crònica [119], apnea obstructiva de la son [120], cirurgia [121], infeccions [121] i algunes malalties reumàtiques [122] (**Taula 5**).

**Taula 5.** Efectes de la inflamació sistèmica en les partícules HDL

Condicció	Marcadors de funcionalitat de les partícules HDL
Malaltia coronària arterial <sup>114</sup>	↑ Oxidació LDL (CFA) ↑ MCP-1 en resposta a la presència de LDL (MCA) ↑ Apo E ↓ TRC
Diabetis mellitus <sup>124, 132</sup>	↓ Activitat antioxidant ↓ Apo A-I, LCAT ↑ Índex inflamatori ↓ <i>Eflux</i> de colesterol mediat per ABCA1
Síndrome metabòlica <sup>118, 125</sup>	↑ MCP-1 en resposta a la presència de LDL (MCA) ↑ Hidroperòxids lipídics
Malaltia renal crònica <sup>119</sup>	↓ Apo A-I, apo A-II i LCAT ↓ Activitat PON1 i GPX3 ↑ SAA
Malaltia reumàtiques <sup>122, 130</sup>	↑ Haptoglobina, hemoglobina i MPO ↓ Activitat PON1 ↓ TRC
Apnea obstructiva del son <sup>120</sup>	↑ Oxidació LDL (CFA)
Cirurgia <sup>121,131</sup>	↑ Índex inflamatori ↓ <i>Eflux</i> de colesterol mediat per ABCA1
Infecció aguda <sup>127</sup>	↑ Oxidació LDL (CFA) ↑ MCP-1 en resposta a la presència de LDL (MCA) ↓ PON1 i PAF-AH

ABCA1: ATP-binding cassette A1; Apo: apolipoproteïna; CFA: assaig lliure de cèl·lules; GPX3: glutatió selenoperoxidasa plasmàtica; LCAT: lecitín-colesterol aciltransferasa; LDL: lipoproteïna de baixa densitat; MCA: assaig de quimiotaxi de monòcits; MCP-1: proteïna quimioattractant de monòcits 1; MPO: mieloperoxidasa; PAF-AH: acetilhidrolasa de factor plaquetari; PON1: paraoxonasa 1; SAA: sèrum amiloid A; TRC: transport revers de colesterol

Diferents factors de risc cardiovascular com el tabac, la malaltia coronària arterial (MC), la diabetis mellitus (DM), i la síndrome metabòlica (SM) han estat associats amb una pèrdua de la capacitat antioxidant i antiinflamatòria de les HDL. El tabac, per exemple, s'ha associat amb una composició i funció anòmala d'aquestes lipoproteïnes. En comparació amb individus no fumadors, els individus fumadors mostren una disminució significativa de la concentració de la LH i de la PLTP, amb un augment de la concentració de la CEPT [123]. La MC es troba normalment associada amb partícules HDL pro-inflamatòries, independentment dels valors circulants de colesterol-HDL [114]. Ansell *et al.* [114] han demostrat que les partícules HDL de pacients amb MC exhibeixen un fenotip pro-inflamatori amb uns índexs inflamatoris de

1,28±0,29 per l'assaig MCA i de 1.37±0.19 pel CFA, en comparació a un grup control d'individus sans amb uns índexs inflamatoris de 0.35±0.11 i 0.66±0.21, respectivament. Curiosament, quan aquests pacients són tractats amb simvastatina (40 mg/dia durant 6 setmanes), els resultats de l'assaig de quimiotaxis de monòcits es redueixen significativament (índex inflamatori de 1.08±0.71), tot i que les HDL encara mostren una lleugera capacitat pro-inflamatòria. Gowri *et al.* [124] han demostrat que les HDL aïllades de pacients amb DM tenen disminuïda la capacitat d'eflux de colesterol mediat per ABCA1. Aquesta pèrdua de la funció de les HDL sembla ser deguda als processos de glicosilació que pateixen les HDL en aquests pacients. Altres estudis en pacients amb DM, mostren que la disfunció de les partícules HDL també s'associa a les modificacions estructurals i químiques que pateixen les diferents apolipoproteïnes i enzims antioxidants associats a la partícula. Utilitzant l'assaig MCA, Watson *et al.* [118] han mostrat que els pacients amb SM presenten HDL pro-inflamatòries i unes concentracions augmentades d'hidroperòxids lipídics en comparació amb un grup de controls amb uns valors similars de colesterol-HDL circulant. Hansel *et al.* [125] també han descrit com les HDL aïllades de pacients amb SM presenten una deterioració de la capacitat antioxidant de les partícules HDL en comparació amb un grup d'individus control normolipèmics. Anomalies en la funcionalitat de les HDL també han estat associades en un altre grup d'individus amb un incrementat risc cardiovascular: dones post-menopàusiques. Zago *et al.* [126] han demostrat que les partícules HDL de dones sanes post-menopàusiques tenen alterada la capacitat d'inhibir l'oxidació de les LDL, i que aquesta pèrdua de capacitat antioxidant es correlaciona positivament amb el contingut de triglicèrids de les HDL, i no pas amb el contingut de colesterol.

D'altra banda, s'ha descrit la presència de partícules HDL amb capacitat pro-inflamatòria en pacients amb inflamació sistèmica deguda a causes no vasculars. Per exemple, individus intervinguts quirúrgicament presenten HDL amb capacitat pro-inflamatòries que, curiosament, reverteixen espontàniament a les 48 hores de la intervenció [121]. La infecció pel virus *influenza* produeix temporalment HDL pro-inflamatòries en models animals amb una disminució de la concentració de PON1, PAFAH i una inhibició de la quimiotaxis de monòcits i de l'oxidació de les LDL [127], potser explicant l'augment de risc d'infart de miocardi que ha estat observat durant les epidèmies de la grip [128]. Algunes condicions reumàtiques s'acompanyen amb un augment significatiu de risc de malaltia coronària. El diagnòstic de lupus eritematós sistèmic (LES) es troba associat amb un risc 50 vegades superior d'infart de miocardi [129], i l'artritis reumatoide (AR) amb un risc entre dues i tres vegades superior de

malaltia coronària, inclús després d'haver controlat els factors de risc tradicionals [130]. McMahon *et al.* [122] han observat que el 48% dels pacients amb LES i el 20% dels individus amb AR presenten HDL pro-inflamatòries en comparació amb un grup d'individus control, i que la capacitat pro-inflamatòria de les HDL es correlaciona positivament amb el curs i activitat de la malaltia, i que en la composició de les seves partícules s'hi ha detectat concentracions significativament més elevades d'haptoglobina, hemoglobina i MPO.

En les malalties renals cròniques també s'ha descrit una funció anòmala de les HDL. Kaysen *et al.* [119] han observat que les HDL aïllades de 32 pacients que rebien hemodiàlisi presentaven una disminució de la seva activitat antioxidant caracteritzada per una reducció significativa de la concentració d'apo A-I, apo A-II i LCAT, així com de l'activitat PON1 i GPX3. Altres estudis han trobat una disminució de l'apo A-I, acompanyada d'un augment molt significatiu de SAA i fosfolipasa secretora A2 (sPLA2) en la superfície de les HDL.

En individus que han patit un transplantament cardíac, sovint associat amb malaltia coronària agressiva, tot i mostrar concentracions elevades de colesterol-HDL, les partícules HDL presenten *in vitro* menys d'una tercera part de l'efectivitat en la promoció de l'*eflux* de colesterol en macròfags [131]. A més a més, la mesura de la dilatació de l'artèria braquial mediada per flux (FMD) en resposta a la infusió d'acetilcolina no varia entre els pacients trasplantats amb diferents concentracions de colesterol-HDL circulant, indicant que la mesura clínica i rutinària dels valors de colesterol-HDL no és un bon predictor d'aterosclerosi en aquests pacients.

En individus amb apnea obstructiva de la son, les partícules HDL mostren una capacitat significativament inferior en la prevenció de l'oxidació de les LDL en comparació a les HDL d'individus control amb les mateixes concentracions circulants de colesterol-HDL [120]. A més a més, la severitat de la malaltia es correlaciona positivament amb el grau de disfunció lipoproteica.

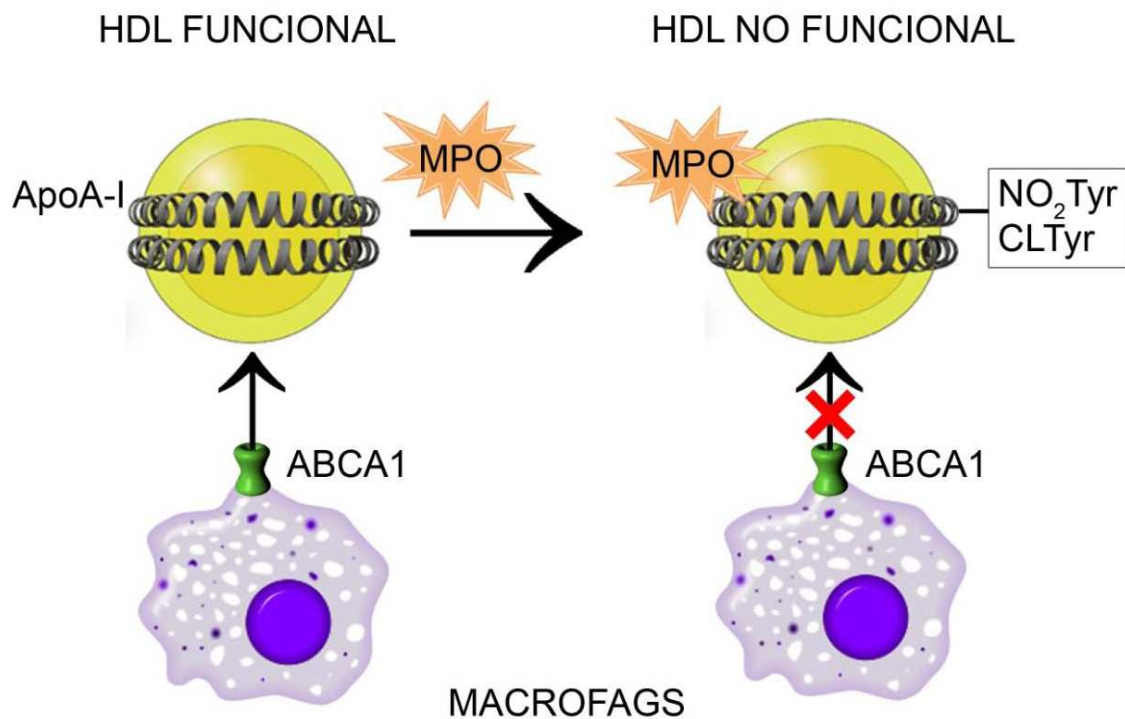
#### **2.4.4.3. Modificacions químiques de les partícules HDL**

S'han descrit diferents mecanismes que podrien conferir característiques pro-inflamatòries a les partícules HDL. En aquest sentit, la glicosilació sembla ser una

modificació particularment rellevant en la diabetis i la resistència a la insulina. Hedrick *et al.* [132] han observat que HDL incubades en presència de concentracions elevades de glucosa durant una setmana mostren una reducció significativa (65%) de l'activitat PON1 i de la capacitat d'inhibir la quimiotaxi de monòcits en resposta a la presència de LDL *in vitro* amb un índex inflamatori  $> 1$ . Aquests resultats *in vitro* són similars als obtinguts *in vivo* en estudis de caracterització de les partícules HDL en pacients amb DM, i mostren que una modificació no enzimàtica clarament pot perjudicar la funció antioxidant de les partícules HDL.

Ferretti *et al.* [133] han observat un augment dosi i temps-depenent de la producció de substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric quan les partícules HDL són incubades a diferents concentracions de glucosa. Els investigadors proposen que el procés de glicosilació de les lipoproteïnes permet per una banda un increment en l'oxidació de les LDL i una disminució de la capacitat antioxidant de les HDL [134]. Així, oxidació i glicosilació de les LDL augmenta la recaptació del receptors *scavenger* en les cèl·lules escumoses i una acceleració del creixement de la placa ateroscleròtica.

Sovint en situacions de resposta a fase aguda s'observen importants alteracions enzimàtiques i estructurals en les partícules HDL. Durant la inflamació sistèmica, les partícules HDL s'enriqueixen de reactants de fase aguda com el SAA i l'apo J, mentre que el contingut en apo A-I, A-II, PON1 i LCAT disminueix [135]. La substitució d'aquests components pels reactants de fase aguda es correlaciona amb una conversió cap a una partícula molt més pro-inflamatòria [135]. D'altra banda, la mieloperoxidasa (MPO, producte enzimàtic dels leucòcits) sembla tenir un paper destacat en aquest procés. Durant la inflamació sistèmica, la MPO pot transformar l'òxid nítric en potents molècules pro-oxidants que faciliten la nitritació, cloració i oxidació de les proteïnes i lípids vasculars [136]. A més a més, la MPO és capaç d'unir-se específicament a l'apo A-I i provocar canvis químics i de conformació específics que afectaran el transport revers de colesterol mediat per ABCA1 [136] (**Figura 6**). A més a més s'ha demostrat que tant la MPO com un dels seus productes, la nitrotirosina, la qual ha estat identificada en plaques d'ateroma, poden ser modulats a través del tractament amb estatines, i són factors independents predictors de malaltia cardiovascular [137-139].



**Figura 6.** La mieloperoxidasa (MPO) específicament s'uneix a l'apolipoproteïna A-I (ApoA-I) i produeix espècies reactives d'oxigen que són les responsables de les modificacions químiques dels residus de tirosina de l'ApoA-I. Conseqüentment, la partícula HDL modificada no és capaç de promoure l'*efflux* de colesterol dependent del receptor ABCA1 dels macròfags.

(Adaptat de JACC 2005;46:1792-8)

### **3. Hipòtesi i Objectius**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

### **3.1. HIPÒTESI**

La infecció pel VIH determina greus trastorns inflamatoris i metabòlics que s'associen amb alteracions de la composició proteica i del tamany de les partícules HDL. L'efecte de la infecció pel VIH sobre les partícules HDL s'acompanya d'un increment de l'aterosclerosi subclínica que presenten aquests pacients, i de la severitat de la pròpia infecció. Conseqüentment, considerem que la concentració en colesterol d'aquestes partícules determinada en els laboratoris clínics té una rellevància clínica relativa en aquest context

### **3.2. OBJECTIUS**

1. Estudiar l'efecte de la infecció pel VIH sobre el tamany, distribució i composició proteica de les partícules HDL.
  - 1.1. Determinar la seva relació amb el tractament antiretroviral i els paràmetres clínics, virològics i immunològics associats amb la infecció.
  - 1.2. Determinar la seva relació amb l'aparició d'alteracions metabòliques i el desenvolupament d'aterosclerosi.
2. Estudiar la rellevància clínica dels valors circulants de colesterol-HDL en pacients infectats pel VIH.
  - 2.1. Avaluar la metodologia actual emprada en la determinació de la concentració de colesterol-HDL.
  - 2.2. Identificar els possibles factors de confusió associats amb la infecció pel VIH.
3. Estudiar la influència relativa de certes variants gèniques sobre l'estat pro-inflamatori associat als pacients infectats pel VIH.
  - 3.1. Determinar la seva relació amb l'aparició d'alteracions metabòliques i el desenvolupament d'aterosclerosi.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

## **4. Resultats**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

## **ESTUDI 1**

**Human immunodeficiency virus-infection induces major changes in high-density lipoprotein particle size distribution and composition: the effect of antiretroviral treatment and disease severity**

*Clin Chem Lab Med 2010;48:1147-52*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

# Human immunodeficiency virus-infection induces major changes in high-density lipoprotein particle size distribution and composition: the effect of antiretroviral treatment and disease severity

Gerard Aragonès<sup>1</sup>, Raül Beltrán-Debón<sup>1</sup>, Anna Rull<sup>1</sup>, Fernando Rodríguez-Sanabria<sup>1</sup>, Laura Fernández-Sender<sup>2</sup>, Jordi Camps<sup>1</sup>, Jorge Joven<sup>1</sup> and Carlos Alonso-Villaverde<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Reus, Universitat Rovira i Virgili, Spain

<sup>2</sup> Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, Reus, Universitat Rovira i Virgili, Spain

**Conclusions:** HIV infection itself may promote major changes in cholesterol distribution among HDL subpopulations that could be partially attenuated by current antiretroviral treatments. Further studies in larger populations are necessary to confirm the impact of HIV on lipoprotein composition and distribution.

Clin Chem Lab Med 2010;48:1147–52.

**Keywords:** antiretroviral therapy; CD4+ T cell; HIV infection; lipoprotein; particle size.

## Abstract

**Background:** Human immunodeficiency virus (HIV) infection is associated with abnormal high-density lipoprotein (HDL) particles. We evaluated whether HIV infection and antiretroviral treatment promotes changes in cholesterol distribution among subpopulations of HDL particles of defined sizes.

**Methods:** HDL particles were isolated from 78 HIV infected patients and fractionated by gel permeation chromatography to obtain five subpopulations. Thirty-six patients were antiretroviral treatment naïve, while 42 patients were treated with efavirenz or protease inhibitors. Uninfected individuals were also included as controls.

**Results:** The distribution of cholesterol across HDL particle sizes was affected by HIV infection itself. Antiretroviral therapy reduced these alterations; only minor changes in small and very small HDL particles were observed in treated patients ( $p=0.01$ ). Untreated patients with low CD4+ T cell counts had less cholesterol in medium ( $p=0.006$ ), small ( $p=0.04$ ) and very small ( $p=0.03$ ) HDL particles. Treated patients with high CD4+ T cell counts had less cholesterol in the largest HDL particles ( $p=0.04$ ), with overall particle distributions resembling those observed in uninfected participants.

## Introduction

High-density lipoproteins (HDLs) are currently monitored using simple laboratory methods that measure cholesterol concentrations. These procedures do not account for the fact that lipoproteins are both heterogeneous, with numerous subfractions, and polydisperse, with a different proportion of components in each subfraction (1–3). Therefore, measurement of overall HDL cholesterol concentration may not accurately reflect the cardioprotective properties of HDL particles. These properties are primarily mediated by its role in reverse cholesterol transport (4), and in preventing oxidation of low-density lipoproteins (LDLs) through the action of paraoxonase-1 (PON1) (5). Other anti-coagulant, anti-apoptotic and anti-inflammatory properties may also contribute to the anti-atherogenic capacities of HDL. HDL particles contain a wide array of proteins that mediate these properties, and their binding affinities may depend on HDL particle size and distribution (6). Moreover, HDL particles reportedly lose their antioxidant and anti-inflammatory properties in several different types of viral infections (7), and during the acute response phase (8). Consequently, changes in HDL subpopulations may be important in determining the function of HDL in patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection. The degree and nature of changes in HDL particles in HIV infected patients are unknown, and data regarding the effects of antiretroviral therapy on HDL particles are scarce (9–11). This topic is especially relevant because the risk of atherosclerosis is substantially increased in these patients (12). Therefore, we tested the hypothesis that changes in HDL particle distribution and composition may be common in these patients and that current therapy could play an important role.

\*Corresponding author: Carlos Alonso-Villaverde, Hospital Universitari Sant Joan, Sant Joan s/n, 43201-Reus, Spain  
Phone: +34 977 310 300, Fax: +34 977 319 984,  
E-mail: cavillaverde@grupsagessa.com

Received December 7, 2009; accepted February 23, 2010;  
previously published online May 20, 2010



**Table 1** Clinical characteristics of the HIV-infected patients (n=78).

Characteristics	
Age, years	38.8 (6.9)
Gender, n (%)	
Male	54 (69.2)
Female	24 (30.8)
Risk factors for HIV, n (%)	
Intravenous drug use	46 (58.9)
Heterosexual contact	23 (29.4)
Male homosexual contact	9 (11.7)
Time since first evidence of HIV infection, years	4.3 (3.6)
HCV infection, n (%)	48 (61.5)
Lipodystrophy, n (%)	17 (21.8)
Treatment scheme, n (%)	
Treatment-naïve	36 (46.2)
Non-nucleoside analogues (efavirenz)	30 (38.4)
Nucleoside analogues (lamivudine or zidovudine)	33 (42.3)
Protease inhibitors (lopinavir/ritonavir)	12 (15.4)
Patients naïve to treatment scheme, n (%)	
Non-nucleoside analogues (efavirenz)	48 (61.6)
Nucleoside analogues (lamivudine or zidovudine)	45 (57.6)
Protease inhibitors (lopinavir/ritonavir)	64 (82.1)
Undetectable HIV-1 RNA viral load <sup>a</sup> , n (%)	51 (65.4)
CD4+ T cell count, cells/ $\mu$ L	447.6 (286.6)

Values are the means and the standard deviations (SD), unless otherwise indicated. <sup>a</sup>Limit of detection: 40 copies/mL.

## Materials and methods

### Subjects and study design

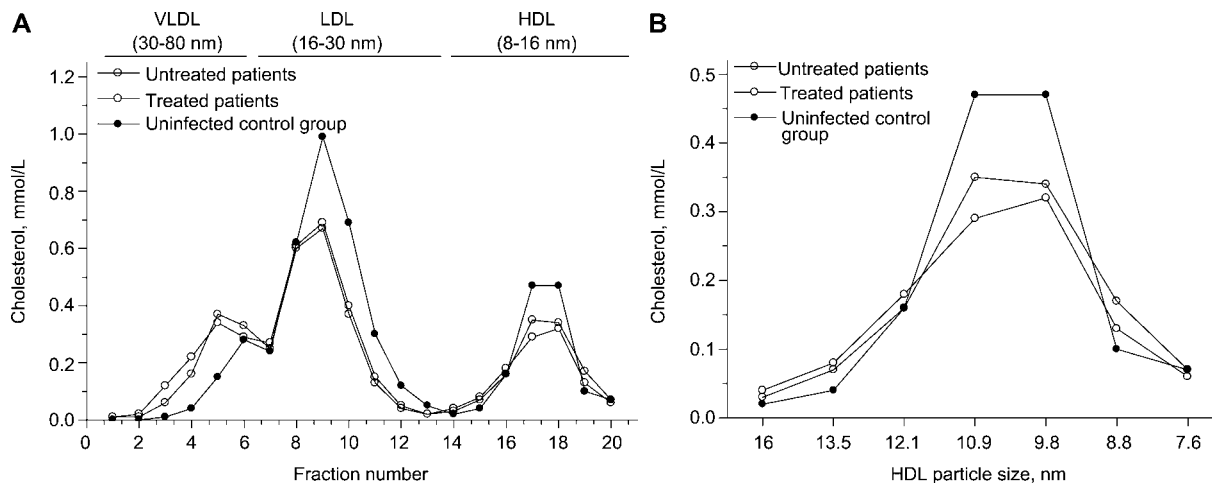
All procedures were approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitari Sant Joan de Reus. A total of 78 HIV infected patients (69.2% male, age range 35–51 years old) were included,

according to a previously published study design (12). Patients were undergoing two different treatment regimens. Thirty-six subjects were antiretroviral treatment-naïve, and 42 had received continuous treatment with an antiretroviral regimen containing lopinavir/ritonavir (n=12) or efavirenz (n=30) for at least 6 months. The antiretroviral adjuvant drugs were zidovudine or lamivudine. All treated patients were naïve to other antiretroviral treatment schemes and had not received previously any type of antiretroviral drugs. Pertinent HIV related clinical and laboratory data were collected for each individual, including age, gender, body mass index (BMI), hepatitis C virus (HCV) co-infections, lipodystrophy (LD), previous AIDS-related diseases, history of opportunistic infections, time since first serologic evidence of HIV infection, HIV-1 RNA viral load and CD4+ and CD8+ T lymphocyte counts. The main clinical characteristics of the HIV infected patients are summarized in Table 1. In an effort to control most of the factors affecting HDL particles, we ensured that both groups of patients (treated and untreated) had similar distributions of patients with HCV co-infection, as well as similar degrees of physical activity, time since first serologic evidence of HIV infection, alcohol and tobacco consumption, and BMI. For selected variables, we also included uninfected control subjects (n=5) who were ostensibly healthy and free of infections.

### Laboratory measurements

Plasma total cholesterol, triglycerides, apolipoprotein A-I (apoA-I) and apolipoprotein A-II (apoA-II) concentrations, and LDL and HDL cholesterol concentrations were measured using standard procedures (13). Plasma C-reactive protein (CRP) concentration was measured using a high-sensitivity immunoassay (Quantex hs-CRP kit; Biokit, Barcelona, Spain). Plasma monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) concentration was measured with an enzyme-linked immunosorbent assay (Human MCP-1 ELISA, PeproTech, London, UK). PON1 activity and concentration were measured as described (5).

HDL subfractionation was performed using high-performance liquid chromatography (HPLC) with gel permeation columns (14). HDL particles were arbitrarily classified into five subgroups on the basis of mean particle size: very large (13.5–16.0 nm), large (12.1 nm), medium (10.9 nm), small (9.8 nm) and very small (8.8 nm).



**Figure 1** Representative lipoprotein chromatographic cholesterol fractionation.

Pooled sera (A) and HDL (B) subfractionation was performed in HIV infected and uninfected control subjects using high-performance liquid chromatography with gel permeation columns. The sizes and positions of very low-density lipoprotein (VLDL), LDL and HDL elution are represented by horizontal lines. Standard deviations are omitted for clarity.

(6.0–8.8 nm). The cholesterol concentrations in each particle size group were measured (Figure 1A, B).

### Statistical analysis

Analysis of variance was used to compare differences between quantitative variables, and the  $\chi^2$ -test was used for categorical variables. The Mann-Whitney U-test was used to compare differences between any two groups of patients, and the Spearman coefficient was used to analyze bivariate correlations. A multiple linear regression model was fitted to evaluate the factors independently associated with cholesterol concentrations among HDL subpopulations in HIV infected patients. The variables included in the model were age, gender, HDL-cholesterol, total cholesterol, triglycerides, BMI, presence of LD, HIV-1 RNA viral load, CD4+ T cell count, antiretroviral drugs and time since first serologic evidence of HIV infection. All statistical analyses were performed using the SPSS statistical package (version 17.0).  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

### Results

HIV infection caused a significant and deleterious effect on HDL particle-specific components with respect to the uninfected group (Table 2). Untreated patients exhibited a significant and deleterious reduction in total HDL cholesterol concentrations that was apparently attenuated in patients undergoing antiretroviral treatment. These differences were probably mediated by the severity of the HIV infection itself, as observed when untreated patients were segregated according to CD4+ T cell count. Untreated patients with counts  $\leq 350$  cell/mL had the lowest HDL-cholesterol and apoA-I and apoA-II concentrations (Table 2). These differences with respect to disease severity were not observed in treated patients. A similar effect was observed in the analysis of selected oxidative and inflammatory markers (Table 2).

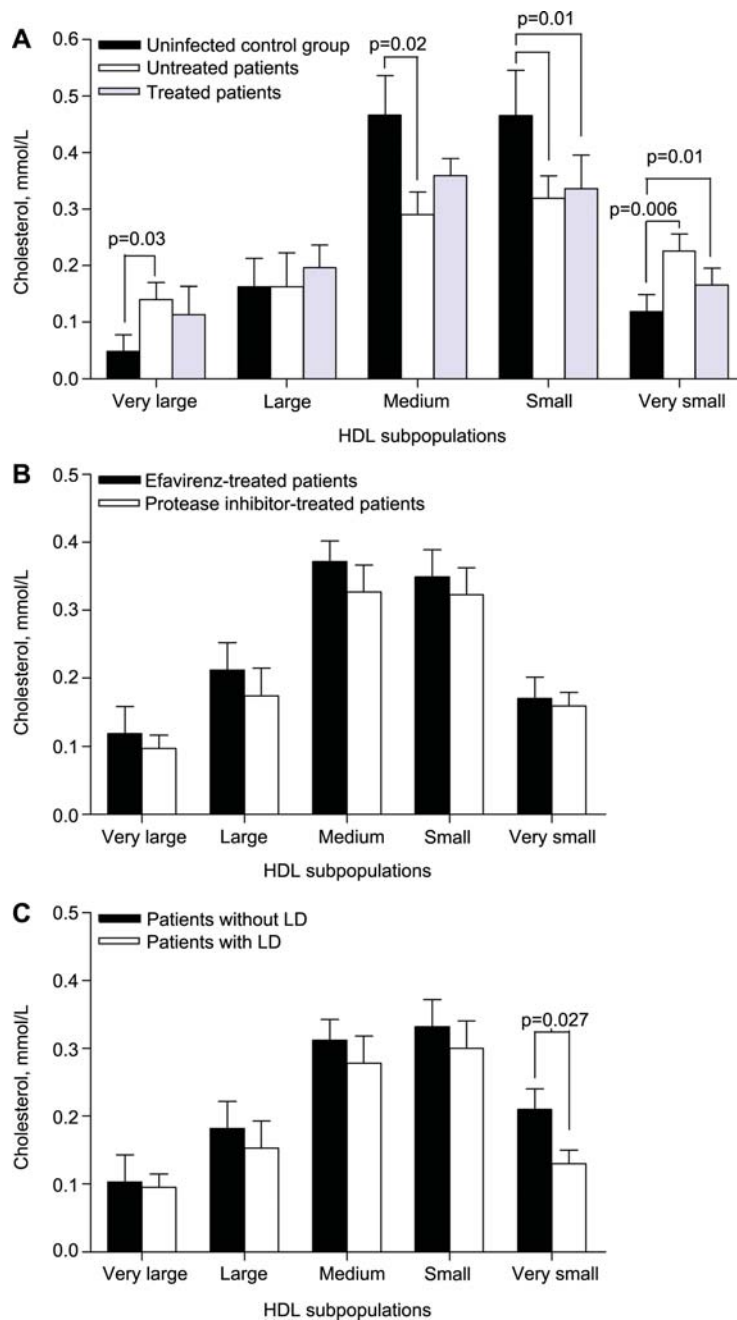
When we evaluated the cholesterol distribution among subpopulations of HDL particles, the effect of HIV infection and treatment was evident. Only the concentration of cholesterol in large HDL particles was unaltered with respect to uninfected participants. Cholesterol in HDL particle populations in untreated HIV infected patients were significantly different with respect to uninfected subjects with respect to the very small ( $p = 0.006$ ), small ( $p = 0.01$ ), medium ( $p = 0.02$ ) and very large ( $p = 0.03$ ) sizes (Figure 2A). However, in the treated HIV infected group, the differences were limited to small ( $p = 0.012$ ) and very small ( $p = 0.019$ ) HDL particles (Figure 2A). We did not observe any significant association between the duration or nature of antiretroviral treatment and cholesterol concentrations among HDL particle populations (Figure 2B). However, patients with LD had significantly lower cholesterol concentrations in very small HDL particles ( $p = 0.027$ ) compared to patients without such condition (Figure 2C).

When both groups of patients were segregated according to disease severity, we observed that untreated patients with a CD4+ T cell count  $\leq 350$  cell/mL had lower cholesterol concentrations in medium ( $p = 0.006$ ), small ( $p = 0.04$ ) and very small ( $p = 0.03$ ) HDL particles compared with untreated

**Table 2** HDL particle-specific lipids/proteins and selected metabolic markers in treated and untreated patients as a whole group or segregated according to the severity of HIV-infection.

	Uninfected control group		HIV-infected patients		Untreated patients		
			Treated patients				
			> 350 CD4+ T/mL (n = 28)	$\leq 350$ CD4+ T/mL (n = 14)	Total (n = 36)	> 350 CD4+ T/mL (n = 23)	$\leq 350$ CD4+ T/mL (n = 13)
<b>HDL-associated components</b>							
Cholesterol, mmol/L	1.53 (0.44) <sup>a</sup>	1.21 (0.59)	1.20 (0.59)	1.23 (0.56)	1.18 (0.37)	1.23 (0.3)	0.88 (0.2) <sup>b</sup>
Triglycerides, mmol/L	0.22 (0.10)	0.19 (0.07)	0.19 (0.08)	0.18 (0.06)	0.19 (0.06)	0.18 (0.08)	0.21 (0.06)
Apolipoprotein A-I, g/L	1.64 (0.33) <sup>a</sup>	1.39 (0.39)	1.40 (0.35)	1.37 (0.42)	1.36 (0.2)	1.45 (0.3)	1.18 (0.25) <sup>b</sup>
Apolipoprotein A-II, g/L	0.40 (0.05) <sup>a</sup>	0.34 (0.07) <sup>c</sup>	0.34 (0.06)	0.34 (0.08)	0.31 (0.06)	0.36 (0.06)	0.28 (0.06) <sup>b</sup>
PONI, mg/L	98.1 (53.9) <sup>a</sup>	132.5 (94.8) <sup>c</sup>	137.8 (95.1)	121.3 (94.2)	181.4 (189.9)	215.7 (213)	169.3 (230.3)
<b>Oxidative and inflammatory markers</b>							
PONI activity, U/L	410.7 (132.5) <sup>a</sup>	339.6 (155.1)	368.9 (162.1)	287.7 (139.9) <sup>b</sup>	337.1 (158.9)	399.2 (91.3)	229.3 (147.4) <sup>b</sup>
MCP-1 concentration, pg/L	61.54 (42.4) <sup>a</sup>	71.07 (39.9)	66.96 (39.9)	78.72 (44.6)	71.1 (32.6)	68.8 (33.1)	82.1 (23.2) <sup>b</sup>
CRP, mg/L	0.75 (0.6) <sup>a</sup>	4.97 (8.2)	5.31 (9.31)	4.05 (3.9)	3.10 (3.7)	2.8 (2.9)	3.6 (3.9)

Values are the means and the standard deviations (SD). CRP, C-reactive protein; PONI, paraoxonase-1; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. both HIV-infected groups; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. patients with  $> 350$  CD4+ T cell/mL; <sup>c</sup> $p < 0.05$  vs. untreated group.

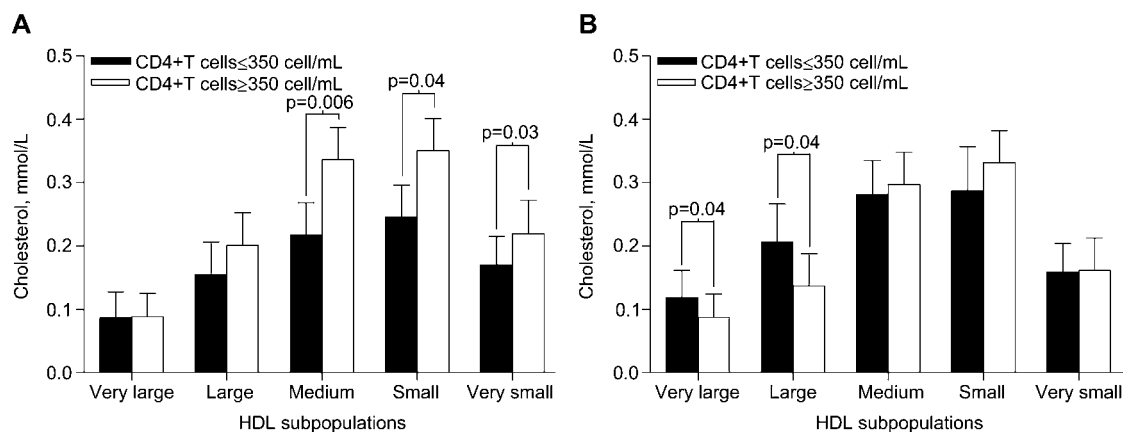


**Figure 2** Effect of HIV infection, antiretroviral treatment and lipodystrophy (LD) on cholesterol concentration distribution among HDL particles.

The effect of HIV infection and treatment was evident. Only the concentration of cholesterol in large HDL particles was unaltered with respect to uninfected participants (A). There were no significant differences between the nature of antiretroviral treatment and cholesterol concentrations among HDL particles (B). Patients with LD had significantly lower cholesterol concentrations in very small HDL particles in comparison to patients without such condition (C). LD indicates lipodystrophy; very large denotes particles between 13.5 and 16.0 nm in size; large, mean particle size 12.1 nm; medium, 10.9 nm; small, 9.8 nm; and very small, between 6.0 and 8.8 nm.

patients with higher counts (Figure 3A). In contrast, treated patients with a CD4+ T cell count  $\leq 350$  cell/mL showed higher cholesterol concentration in very large and large HDL particles ( $p=0.04$ ) compared with treated patients with higher counts (Figure 3B). These results indicate that the severity of disease is a major determinant in cholesterol distribution among HDL populations.

In multivariate analysis, age, gender, HDL cholesterol concentrations and CD4+ T cell counts contributed significantly in explaining the distribution of cholesterol concentrations among the main HDL populations in HIV infected patients. Of note, antiretroviral treatment only showed a significant, and independent relationship with cholesterol concentrations in very large ( $B=0.328$ ;  $p=0.021$ ) and very



**Figure 3** Effect of severity of infection on cholesterol concentration distribution among HDL particles. The severity of HIV infection, defined by the CD4+ cell count at the time of HDL measurements, had different effects in untreated patients (A) and treated patients (B). Very large denotes particles between 13.5 and 16.0 nm in size; large, mean particle size 12.1 nm; medium, 10.9 nm; small, 9.8 nm; and very small, between 6.0 and 8.8 nm.

small ( $B=0.501$ ;  $p=0.004$ ) HDL particles. HIV-1 RNA viral load showed a strong significant relationship with cholesterol concentration in large ( $B=0.521$ ;  $p=0.011$ ) and medium ( $B=0.542$ ;  $p=0.013$ ) HDL particles in untreated HIV infected patients.

Apo A-I concentrations were significantly and positively related to cholesterol concentrations in all HDL particle subtypes of both groups of patients considered. However, in patients treated with efavirenz, apoA-II was only positively correlated with the amount of cholesterol in medium, small and very small HDL particles ( $\rho=0.447$ ,  $p=0.006$ ;  $\rho=0.427$ ,  $p=0.009$ ; and  $\rho=0.392$ ,  $p=0.01$ , respectively). These results suggest that protein composition is normalized as a result of antiretroviral treatment. PON1 concentrations did not show any relationship with cholesterol particle size distribution. However, PON1 activity was significantly higher in very small HDL particles ( $p=0.03$ ). This finding was further confirmed with multivariate analyses [ $B=14.8$  (2.14–25.7);  $p=0.02$ ]. In addition, the concentration of cholesterol in very large HDL particles was positively associated with plasma CRP [ $B=2.83$  (0.32–4.9);  $p=0.047$ ]. However, plasma MCP-1 was inversely associated with the concentration of cholesterol in small HDL particles [ $B=-3.12$  (-6.8 to -0.67);  $p=0.019$ ]. No differences were observed among groups.

## Discussion

During metabolic and/or inflammatory stress, HDL particles may lose their anti-inflammatory and anti-oxidative properties. They may even become dysfunctional, exhibiting pro-inflammatory and consequently pro-atherogenic effects (8). This phenomenon is likely due to changes in the composition of proteins that are normally associated with HDL through the displacement and/or exchange by acute phase reactants. Altered HDL cholesterol concentrations are common in HIV infected patients and are usually attributed to the effects of antiretroviral drugs (11). However, it is also possible, as

demonstrated by our data, that HIV infection itself may have a profound impact on HDL particle metabolism, and these changes may be directly related to the severity of the disease. These changes may be at least partially reversed by adequate antiretroviral treatment strategy. We also show that the current clinical assessment of HDL, i.e., measuring its cholesterol concentration, may be not adequate to fully understand the heterogeneous and polydisperse nature of these lipoproteins.

Moreover, as previously suggested, various HDL subpopulations may play different causal roles in coronary heart disease (15–18). HIV infected patients had active inflammatory stimuli, as indicated by high plasma concentrations of plasma CRP and MCP-1. Both of these are accepted biomarkers of inflammation and potential biomarkers of cardiovascular risk (19). Such inflammatory stress is probably associated with the observed changes in HDL-related variables.

It is not fully understood whether HDL subfractionation may add relevant information to the function of HDL in the absence or presence of HIV treatment. Here, we present novel evidence that the cholesterol concentration of large HDL particles (ranging from 12 to 16 nm) may vary substantially during treatment, and that it is significantly correlated with plasma CRP concentrations. Conversely, HDL particles smaller than 11 nm had lower cholesterol concentrations in untreated patients with more severe disease (CD4+ T cell count <350 cell/mL), which was also associated with lower PON1 activity and higher circulating MCP-1 concentrations. We speculate that untreated patients with higher degrees of immunosuppression have HDL particle distributions that are pro-inflammatory and have fewer anti-oxidant properties. Also, HIV infection itself may have a deleterious but reversible effect on HDL function. It remains to be determined whether such variations add further significance to the accelerated atherosclerosis observed in these patients. However, these results are concordant with our previous finding that higher plasma MCP-1 concentration and lower PON1 activity are associated with higher rates of atherosclerosis (12, 20).



A limitation to this study is that the number of patients included was relatively low. This aspect limits the validity of the conclusions, which should be confirmed in larger populations. Another drawback was the cross-sectional study design which resulted in our inability to indicate a causality of HIV infection regarding a significant and deleterious effect on HDL particle-specific components compared to the uninfected control group. A valuable study design would be to investigate patients before antiretroviral therapy and afterwards, with sufficiently long follow-up and different time points to exclude variability of measurements.

In conclusion, our data are consistent with the hypothesis that HIV infection may modify HDL particle size distribution of cholesterol and proteins, and these changes cannot be assessed with current clinical methods. Thus, adequately controlling HIV infection may be critical to maintaining the physiological role of HDL.

## Acknowledgements

The study was financially supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI08/1032, PI08/1381 and PI08/1175). GA, RB and AR are recipients of a grant from Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu. FRS is a visiting scientist from the Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. Editorial assistance was from Dr. Ginger M. of American Journal Experts (6031-5A73-7B81-D915-7450).

## Conflict of interest statement

**Authors' conflict of interest disclosure:** The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

**Research funding:** None declared.

**Employment or leadership:** None declared.

**Honorarium:** None declared.

## References

1. 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.
2. Li Z, McNamara JR, Ordovas JM, Schaefer EJ. Analysis of high-density lipoproteins by a modified gradient gel electrophoresis method. *J Lipid Res* 1994;35:1698–711.
3. Delalla OF, Elliot HA, Gofman JW. Ultracentrifugal studies of high-density serum lipoproteins in clinically healthy adults. *Am J Physiol* 1954;179:333–7.
4. Gwynne JT. High density lipoprotein cholesterol levels as a marker of reverse cholesterol transport. *Am J Cardiol* 1989;64:10–7.
5. Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraoxonase I activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. *Am J Cardiovasc Drugs* 2004;4:211–7.
6. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the anti-inflammatory properties of HDL. *J Clin Invest* 2007;117:746–56.
7. Van Lenten BJ, Wagner AC, Nayak DP, Hama S, Navab M, Fogelman AM. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza infection. *Circulation* 2001;103:2283–8.
8. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, et al. 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.
9. Bernal E, Masiá M, Padilla S, Gutiérrez F. High-density lipoprotein cholesterol in HIV-infected patients: evidence for an association with HIV-1 viral load, antiretroviral therapy status, and regimen composition. *AIDS Patient Care STDS* 2008;22:569–75.
10. Rose H, Hoy J, Woolley I, Tchoua U, Bukrinsky M, Dart A, et al. HIV infection and high density lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis* 2008;199:79–86.
11. Rose H, Woolley I, Hoy J, Dart A, Bryant B, Mijch A, et al. HIV infection and high-density lipoprotein: the effect of the disease vs the effect of treatment. *Metabolism* 2006;55:90–5.
12. Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, Montero M, Calvo N, Tous M, et al. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation* 2004;110:2204–9.
13. Matas C, Cabré M, La Ville A, Prats E, Joven J, Turner PR, et al. Limitations of the Friedewald formula for estimating low-density lipoprotein cholesterol in alcoholics with liver disease. *Clin Chem* 1994;40:404–6.
14. Usui S, Hara Y, Hosaki S, Okazaki M. A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC. *J Lipid Res* 2002;43:805–14.
15. Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:870–6.
16. Arsenault BJ, Lemieux I, Després JP, Gagnon P, Wareham NJ, Stros ES, et al. HDL particle size and the risk of coronary heart disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Atherosclerosis* 2009;206:276–81.
17. El Harchaoui K, Arsenault BJ, Franssen R, Després JP, Hovingh GK, Stros ES, et al. High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. *Ann Intern Med* 2009;150:84–93.
18. Asztalos BF, Roheim PS, Milani RL, Lefevre M, McNamara JR, Horvath KV, et al. Distribution of ApoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2670–6.
19. Parra S, Coll B, Aragones G, Marsillach J, Beltrán R, Rull A, et al. Nonconcordance between subclinical atherosclerosis and the calculated Framingham risk score in HIV-infected patients: relationships with serum markers of oxidation and inflammation. *HIV Medicine* 2009 [in press].
20. Parra S, Alonso-Villaverde C, Coll B, Ferré N, Marsillach J, Aragones G, et al. Serum paraoxonase-1 activity and concentration are influenced by human immunodeficiency virus infection. *Atherosclerosis* 2007;194:175–81.

## **ESTUDI 2**

### **Pitfalls in measuring high-density lipoprotein cholesterol concentrations in HIV-infected patients**

*HIV Med 2010;11:260-5*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

# Pitfalls in measuring high-density lipoprotein cholesterol concentrations in HIV-infected patients

G Aragonès,<sup>1</sup> R Beltrán,<sup>1</sup> A Rull,<sup>1</sup> J Marsillach,<sup>1</sup> F Rodríguez,<sup>1</sup> SB Ali,<sup>1</sup> L Fernández-Sender,<sup>2</sup> J Camps,<sup>1</sup> J Joven<sup>1</sup> and C Alonso-Villaverde<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain and <sup>2</sup>Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

## Objectives

HIV infection and its treatment are associated with dyslipidaemia and increased risk of cardiovascular disease. Accurate high-density lipoprotein (HDL) cholesterol values are necessary for the management of these abnormalities, but current methods have not been properly assessed in these patients. The aim of this study was to assess in HIV-infected patients the consistency and accuracy of a synthetic polymer/detergent homogeneous assay used to measure HDL cholesterol concentrations and to evaluate the impact of storage.

## Methods

HDL cholesterol was measured using a synthetic polymer/detergent homogeneous method in samples from HIV-infected patients and healthy subjects for each of the storage regimens: baseline, after 1 week at 4 °C, and after 12 months at – 80 °C. The ultracentrifugation and precipitation assays were used for comparison.

## Results

Three out of every 20 samples from HIV-infected patients had discrepant HDL cholesterol values with respect to the ultracentrifugation method. Overestimation was associated with high C-reactive protein concentrations and underestimation with plasma  $\gamma$ -globulin concentrations, an effect that was amplified by any of the storage conditions tested.

## Conclusions

Caution is needed when using the synthetic polymer/detergent homogeneous method for direct measurement of HDL cholesterol concentrations in HIV-infected patients. This assay is of limited use in clinical trials in which frozen samples are analysed.

**Keywords:** high-density lipoproteins, HIV, measurement methods, sample storage.

Accepted 28 July 2009

## Introduction

Pro-atherogenic metabolic disturbances in HIV-infected patients are increasingly a clinical concern because of the higher cardiovascular disease risk observed in these patients with respect to uninfected populations [1]. Low high-density lipoprotein (HDL) cholesterol concentrations are common and characterize dyslipidaemia in patients undergoing long-term antiretroviral therapy [2], resulting in an increased incidence of cardiovascular events [3]. Consequently, clinical laboratories should provide accurate

and reliable measurements of HDL cholesterol as part of the continuous management and evaluation of these patients [4].

Automated homogeneous assays have been adopted for the direct quantification of HDL cholesterol in clinical laboratories. However, although these methods show good agreement with reference methods in healthy subjects [5], falsely low HDL cholesterol concentrations have been observed in patients with different disease states [6,7]. HIV infection results in persistent inflammatory stimuli [8] and HDL particles have been reported to lose their athero-protective properties (i.e., cholesterol efflux capacity, and anti-oxidative and anti-inflammatory activities) during inflammation and could be modified during the acute response phase [9]. It is unknown whether major changes

Correspondence: Dr Carlos Alonso-Villaverde, Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari Sant Joan, Sant Joan s/n, 43201-Reus, Spain. Tel: + 34 977 310 300; fax: + 34 977 319 984; e-mail: cavillaverde@grupsagessa.com



in HDL particles are elicited by HIV infection and data on the impact of such changes on HDL cholesterol measurements obtained using the homogeneous assay have not been properly assessed. Moreover, hepatitis C virus (HCV) coinfection may be relevant in Mediterranean area, where injecting drug use is a predominant cause of HIV infection [10]. Multiple viral infections may represent an additional confounding factor in homogeneous assays [11], and progressive liver dysfunction may produce abnormal HDL particles which may be a source of inaccuracies in HDL cholesterol measurements. Additionally, the effect of sample storage on serum HDL cholesterol concentration measurements should be assessed because most epidemiological and research studies are performed on samples that have been stored at different temperatures for different periods of time. The stability of HDL particles obtained from HIV-infected patients has not been determined previously, despite the fact that there is direct and indirect evidence indicating structural and compositional modifications in HDL as a consequence of HIV infection and/or its treatment [12]. Therefore, in this study, we aimed to assess the agreement among three methods for measuring HDL cholesterol concentrations, to evaluate the impact of storage and to identify possible confounding factors.

## Methods

### Study participants

Sixty-one consecutive HIV-infected patients attending our clinic were invited to participate in the study after pertinent data had been collated from medical records. Exclusion criteria were age <18 years, presentation of AIDS-related opportunistic diseases, hypertriglyceridaemia ( $\geq 4.5$  mmol/L), renal failure or myocardial infarction. Patients with liver cirrhosis or major liver disease according to clinical and laboratory assessments were also excluded [13].

Patients were on various treatment regimens: (i) not on treatment but with active HIV replication ( $n=20$ ); (ii) on treatment with an efavirenz-based regimen ( $n=25$ ) and (iii) on treatment with a lopinavir/ritonavir-based regimen ( $n=16$ ). Treated groups had been under antiretroviral therapy for more than 12 months and the adjuvant drugs used were zidovudine or lamivudine. The control group consisted of 49 apparently healthy, uninfected individuals participating in a routine health check. All participants gave written informed consent and the Ethics Committee of the Hospital Universitari de Sant Joan approved the study.

A fasting blood sample was collected and serum aliquots were stored in sterile conditions either at 4 °C for 1 week or

at -80 °C for 12 months. Serum HDL cholesterol concentrations were then measured within a few hours of blood collection and in each of the storage regimens using a homogeneous assay. We used the ultracentrifugation and dextran sulphate precipitation (DSP) procedures for comparison.

### Homogeneous assay

Samples were assayed using a homogeneous assay based on the synthetic polymer/detergent method, version 3 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) [7,14]. Briefly, 2  $\mu$ L of plasma was incubated for 3.5 min with 210  $\mu$ L of a mixture of polymers and polyanions that block the apoprotein B-containing lipoprotein particles. Noncomplexed cholesterol was measured using the cholesterol oxidase-peroxidase method.

### Ultracentrifugation

Isolation of the HDL fraction was performed in a Centricon 75 ultracentrifuge (Kontron Instruments Ltd, Watford, UK) using a Kontron TFT 45.6 fixed angle rotor, according to Havel et al. [15]. For all comparisons, the result obtained was considered to be the true HDL cholesterol value.

### Precipitation procedure

Following a procedure previously described [16], 500  $\mu$ L of serum was mixed with 50  $\mu$ L of a solution containing 500 mmol/L  $MgCl_2$  and 10 g/L dextran sulphate (molecular weight 50 000 Da). After incubation at room temperature for 10 min, the reaction mixture was centrifuged at 3000  $g$  at 4 °C for 15 min to pellet the apoprotein B-containing lipoproteins, and cholesterol was measured in the supernatant.

### Other laboratory measurements

Antibodies against HCV were measured by immunoassay in an automated analyser (Abbott AxSYM, Abbott Park, IL, USA). C-reactive protein (CRP) and apolipoprotein A-I (apoA-I) concentrations were analysed in a turbidimetric immunoassay (Beckman-Coulter).  $\gamma$ -Globulin was separated and quantified by capillary electrophoresis in a Paragon CZE 2000 (Beckman-Coulter).

### Statistical analysis

The agreement among methods was estimated by bivariate correlations using the Spearman rank coefficient and by the Bland-Altman graphical procedure [17]. The

differences between the means of HDL cholesterol concentrations obtained in the different storage regimens with the homogeneous assay were compared using Student's *t*-test. Univariate analysis was used to identify the variables with significant contributions to these differences, and a multiple linear regression model was fitted to evaluate independent associations in HIV-infected patients. The most influential variables included in the model were age, sex, total cholesterol, triglycerides, CRP, glucose and HDL cholesterol concentrations measured at baseline,  $\gamma$ -globulin values and HIV-related variables. All statistical procedures were performed with the SPSS 17.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## Results

Most HIV-infected patients in this study were smokers (69.1%), 39 (63.9%) were male, and their ages ranged from 29 to 64 years. Forty-one patients (67%) had undetectable HIV-1 viral load. Obesity was not found in these patients but 19 (31%) showed severe lipodystrophy. The predominant cause of infection was injecting drug use (61%) and in the remaining patients, sexual factors were positively identified. Laboratory assessment in 36 (59%) HCV-coinfected patients showed that liver impairment, if present, was negligible for the purpose of this study.

### Comparison among methods

Previous studies have clearly established that the homogeneous assay produces results that are concordant with those of the ultracentrifugation and precipitation methods in control subjects [7]. For this reason, agreement among the three methods in control subjects was not evaluated in the present study. In HIV-infected patients, Spearman correlation coefficients in comparisons of the methods were highly significant (homogeneous *vs.* ultracentrifugation:  $y = 0.89x - 0.13$ ;  $r = 0.94$ ,  $P < 0.001$ ; homogeneous *vs.* DSP:  $y = 0.92x - 0.08$ ;  $r = 0.97$ ,  $P < 0.001$ ), indicating good correlations among methods. This was further confirmed when we assessed the degree of agreement using Bland-Altman plots (Fig. 1a and b). However, when comparing the homogeneous method and ultracentrifugation, we found that 16.4% of samples showed discrepancies of  $> 1$  standard deviation (SD). We did not identify clinical variables related to this discrepancy, but those patients whose HDL cholesterol concentrations were overestimated by the homogeneous assay showed significantly higher plasma CRP concentrations [11.5 (6.9) *vs.* 6.26 (2.15) mg/L for other patients;  $P = 0.03$ ], suggesting that they had higher concentrations of altered-pro-inflammatory HDL particles. Patients whose HDL cholesterol concentrations

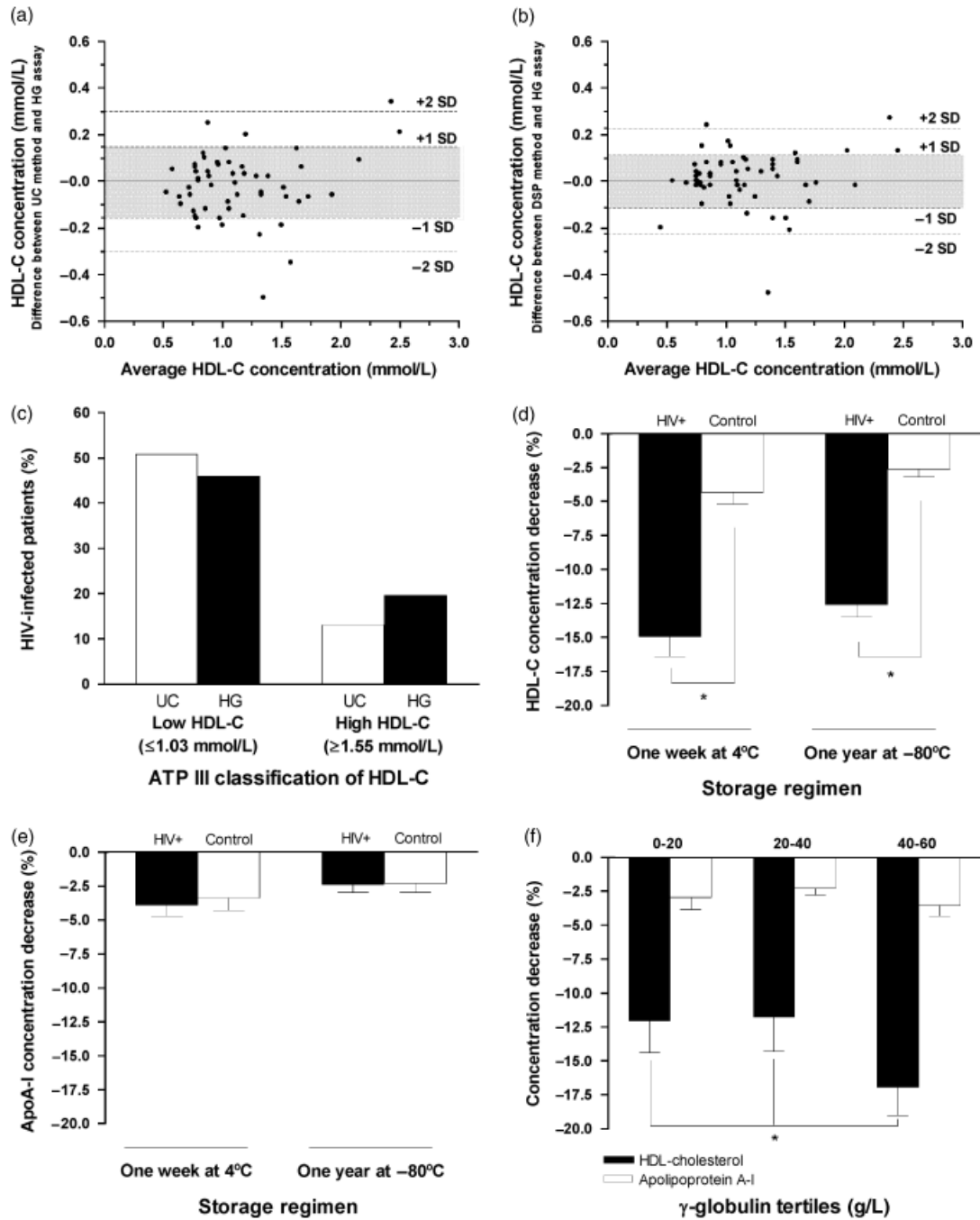
were underestimated showed a trend towards higher plasma  $\gamma$ -globulin concentrations [24.70 (7.9) *vs.* 19.31 (7.4) g/L for other patients;  $P = 0.1$ ]. Notably, HCV-coinfected patients had higher ( $P = 0.03$ ) plasma  $\gamma$ -globulin concentrations [20.99 (7.9) g/L] than patients who were not coinfecting [16.84 (4.5) g/L]. However, we did not detect any relationship between HCV coinfection and changes in the overall lipoprotein profile.

To assess the clinical significance of these discrepancies among methods, HDL cholesterol values (obtained using the homogeneous method or ultracentrifugation) were used to assign HIV-infected patients as having low or high HDL cholesterol concentrations. For this purpose, we applied the Framingham risk score based on the Adult Treatment Panel III (ATP III) classification of HDL cholesterol [18]. As shown in Figure 1c, the total percentage of misclassifications was 11.4%.

### Impact of storage on HDL cholesterol measurement: the role of plasma $\gamma$ -globulin concentrations

We found that the HDL cholesterol values for stored samples were significantly lower than the baseline measurements [at baseline: 1.14 (0.4) mmol/L; storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 1 year: 1.05 (0.4) mmol/L;  $P < 0.001$  *vs.* baseline; storage at  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 week: 1.02 (0.4) mmol/L;  $P < 0.001$  *vs.* baseline]. As shown in Figure 1d, the effect of storage regimen on HDL cholesterol concentration was more pronounced in HIV-infected patients than in control subjects. Most samples from HIV-infected patients showed lower HDL cholesterol values compared with baseline, but in healthy subjects lower values were only found for 35% of the samples. However, other changes in particle composition were unlikely because an effect of storage was not found when the apoA-I concentration was measured (Fig. 1e), indicating that apoA-I is less influenced by the storage conditions. Among the variables studied, none showed a significant impact in control samples, but in samples from HIV-infected patients we found a positive and significant correlation between the decrease of HDL cholesterol values and plasma  $\gamma$ -globulin concentrations in both storage regimens (at  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 week:  $y = 0.01x + 0.05$ ;  $r = 0.37$ ,  $P < 0.003$ ; at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 1 year:  $y = 0.003x + 0.07$ ;  $r = 0.25$ ,  $P < 0.05$ ). This was further confirmed with multivariate analyses either in samples stored at  $4^{\circ}\text{C}$  [ $B = 0.008$  ( $-0.004$  to  $0.012$ );  $P < 0.001$ ] or in samples stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  [ $B = 0.006$  ( $0.002$ - $0.010$ );  $P = 0.004$ ]. However, as illustrated in Figure 1f, we did not observe a significant impact of plasma  $\gamma$ -globulin concentration on apoA-I determination.

Moreover, the formula resulting from the application of linear regression analysis, with apoA-I and  $\gamma$ -globulin



**Fig. 1** HDL cholesterol concentration measurements (a, b) Bland–Altman plots for high-density lipoprotein (HDL) cholesterol concentrations to assess the degree of agreement between the homogeneous assay and (a) ultracentrifugation or (b) dextran sulphate precipitation in HIV-infected patients. (c) The percentage of HIV-infected patients having low or high HDL cholesterol concentrations (based on the ATP III classification) differed depending on which value of HDL cholesterol (obtained using ultracentrifugation or the homogeneous assay) was used. (d, e) The percentage reductions in (d) HDL cholesterol and (e) apolipoprotein A-I concentrations after storage for 1 week at 4°C according to  $\gamma$ -globulin concentrations. (f) Impact of plasma  $\gamma$ -globulin concentrations on HDL cholesterol and apolipoprotein A-I determinations in HIV-infected patients. DSP, dextran sulphate precipitation; HDL-C, HDL cholesterol; HG, homogeneous assay; HIV +, HIV-infected patients; SD, standard deviation; UC, ultracentrifugation; \* $P < 0.001$ .

concentrations included in the model, was HDL cholesterol =  $-0.85 + [1.2 \times \text{apoA-I (g/L)}] + [0.011 \times \gamma\text{-globulin (g/L)}]$ , and this predicts 80% of the variance in the true HDL cholesterol values (ultracentrifugation).

## Discussion

The inverse association between HDL cholesterol concentration and the risk of coronary disease has been established in epidemiological studies [3]. Consequently, HDL cholesterol and other lipid measurements are included in current clinical practice guidelines [18].

In clinical laboratories, the development of the so-called homogeneous assays has been welcomed and rapidly accepted world-wide. However, these methods have shown inaccuracies in patients with cardiovascular, renal and hepatic disorders [7]. Our data in this study indicate that this is also the case for HIV-infected patients. We found discrepancies in three out of every 10 measurements, and, to further complicate the interpretation, we found both positive and negative inaccuracies. We confirm the findings of previous reports that associated hyper- $\gamma$ -globulinaemia with negative inaccuracies [11]. Positive inaccuracies have already been described in these assays as a consequence of the elevated triglycerides in very low-density lipoprotein particles [19]. Although our results are not consistent with this finding, previous studies suggest that HCV coinfection may represent a confounding factor in patients with significant liver impairment and/or uncontrolled viral replication. For economic and technical reasons, other methods cannot be recommended for the determination of HDL cholesterol levels in these patients in fully automated medical laboratories in our hospitals, but a note of caution should be added to final reports in order to facilitate thorough evaluation by the clinician.

It is common practice in clinical and epidemiological studies to store one or more aliquots of serum from participants. This approach, although used extensively, is not valid when the stability of the component during storage has not been determined. It is already known that the storage process may affect the precipitation and ultracentrifugation methods [20], an effect that has been attributed to the relative instability of HDL particles. We extend these findings to the homogeneous assay in healthy subjects. However, the observed decrease was significantly greater in samples from HIV-infected patients, and this was clearly related to the initial plasma concentration of  $\gamma$ -globulin. Although linear regression analysis resulted in a formula that predicts 80% of the variance in HDL cholesterol values, further studies are needed to enable accurate adjustment of HDL cholesterol levels measured using the homogeneous assay.

In conclusion, lipid research laboratories supporting long-term clinical trials should take into account the limitations of the synthetic polymer/detergent homogeneous method to measure HDL cholesterol concentrations and interpret with caution the results obtained. These considerations are important because the development of antiretroviral therapy may cause cardiovascular disease to become an increasingly common cause of death in HIV-infected patients. The results from the present study suggest that the monitoring of HDL levels in these patients should not be based only on HDL cholesterol measurements, but should include the concentration of serum apoA-I, which is more stable and is a key molecule involved in many of the physiological functions of HDL.

## Acknowledgements

Financial support for this work was provided by the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI08/1032, PI05/1606 and PI05/1607). GA, RB and AR are the recipients of a grant from the Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu. FR is a visiting scientist from the Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. The authors are indebted to Dr Blai Coll for his invaluable scientific support and M<sup>a</sup> Asunción González and Mercedes Heras for their nursing and technical assistance.

## References

- 1 Friis-Moller N, Weber R, Reiss P *et al.* Cardiovascular disease risk factors in HIV patients—association with antiretroviral therapy: results from the DAD study. *AIDS* 2003; **17**: 179–193.
- 2 Alonso-Villaverde C, Segues T, Coll-Crespo B *et al.* High-density lipoprotein concentrations relate to the clinical course of HIV viral load in patients undergoing antiretroviral therapy. *AIDS* 2003; **17**: 1173–1178.
- 3 Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC *et al.* High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; **62**: 707–714.
- 4 Dube MP, Stein JH, Aberg JA *et al.* Guidelines for the evaluation and management of dyslipidemia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults receiving antiretroviral therapy: recommendations of the HIV Medical Association of the Infectious Disease Society of America and the Adult AIDS Clinical Trials Group. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 613–627.

- 5 Warnick GR, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. *Clin Chem* 2001; **47**: 1579–1596.
- 6 Camps J, Simo JM, Guaita S *et al*. Altered composition of lipoproteins in liver cirrhosis compromises three homogeneous methods for HDL-cholesterol. *Clin Chem* 1999; **45**: 685–688.
- 7 Simo JM, Castellano I, Ferre N *et al*. Evaluation of a homogeneous assay for high-density lipoprotein cholesterol: limitations in patients with cardiovascular, renal, and hepatic disorders. *Clin Chem* 1998; **44**: 1233–1241.
- 8 Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* 2008; **214**: 231–241.
- 9 Jahangiri A, de Beer MC, Noffsinger V *et al*. HDL remodeling during the acute phase response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**: 261–267.
- 10 Sherman KE, Rouster SD, Chung RT *et al*. Hepatitis C virus prevalence among patients infected with human immunodeficiency virus: a cross-sectional analysis of the US Adult AIDS Clinical Trials Group. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 831–837.
- 11 Zapico-Muniz E, Jorba-Castany O, Bonet-Marques R *et al*. A cause of falsely low HDL concentrations in HIV-infected patients: increased polyclonal serum immunoglobulin. *Clin Biochem* 2005; **38**: 46–49.
- 12 Asztalos BF, Schaefer EJ, Horvath KV *et al*. Protease inhibitor-based HAART, HDL, and CHD-risk in HIV-infected patients. *Atherosclerosis* 2006; **184**: 72–77.
- 13 Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL *et al*. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; **60**: 646–649.
- 14 Kurosai Y, Hachimura K, Ogawa Z. With a novel evaluation method comparison of 2 homogeneous assay kits for high density lipoprotein cholesterol. *Clin Chim Acta* 2009; **401**: 110–113.
- 15 Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; **34**: 1345–1353.
- 16 Warnick G, Benderson J, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg<sup>2+</sup> precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982; **28**: 1379–1388.
- 17 Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; **1**: 307–310.
- 18 National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the NCEP final report. *Circulation* 2002; **106**: 3143–3421.
- 19 Cobbaert C, Zwang L, Ceriotti F *et al*. Reference standardization and triglyceride interference of a new homogeneous HDL-cholesterol assay compared with a former chemical precipitation assay. *Clin Chem* 1998; **44**: 779.
- 20 Bachorik PS, Walker R, Brownell KD *et al*. Determination of high density lipoprotein-cholesterol in stored human plasma. *J Lipid Res* 1980; **21**: 608–616.

## **ESTUDI 3**

**Host-pathogen interactions in the development of  
metabolic disturbances and atherosclerosis in HIV  
infection: the role of CCL2 genetic variants**

*Cytokine 2010;51:251-258*

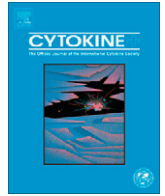
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/issn/10434666](http://www.elsevier.com/locate/issn/10434666)



## Host–pathogen interactions in the development of metabolic disturbances and atherosclerosis in HIV infection: The role of *CCL2* genetic variants

Carlos Alonso-Villaverde<sup>a,\*</sup>, Gerard Aragonès<sup>b</sup>, Raúl Beltrán-Debón<sup>b</sup>, Laura Fernández-Sender<sup>a</sup>, Anna Rull<sup>b</sup>, Fernando Rodríguez-Sanabria<sup>b</sup>, Judit Marsillach<sup>b</sup>, Pedro Pardo-Reche<sup>a</sup>, Jordi Camps<sup>b</sup>, Jorge Joven<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Sant Joan, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

<sup>b</sup> Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 July 2009

Received in revised form 26 March 2010

Accepted 18 May 2010

#### Keywords:

Genotype

Haplotype

HIV

Inflammation

Insulin resistance

### ABSTRACT

**Background:** Circulating *CCL2* concentration has been implicated in promoting atherosclerosis in patients infected with HIV. We evaluated whether *CCL2* gene variants are associated with metabolic disturbances and plasma *CCL2* levels in HIV-infected patients. **Methods and results:** *CCL2* genotypes and estimated haplotypes, plasma *CCL2* levels and indicators of metabolic status in HIV-infected patients were compared with a representative group of the general population. We also performed a carotid/femoral artery ultrasonography to detect sub-clinical atherosclerosis in these patients. Six haplotypes were estimated in more than the 5% of individuals, and accounted for more than 98% of the population. In HIV-infected patients, carriers of H1, H2 and H5 haplotypes had higher *CCL2* concentration than carriers of H3, H4 and H6 haplotypes. However, only carriers of H1 and H5 haplotypes presented higher insulin resistance as well as higher proportion of patients affected with sub-clinical. Conversely, carriers of H2 haplotype, which also showed high plasma *CCL2* concentration, were associated with less deleterious metabolic disturbances. **Conclusions:** Our data are consistent with the hypothesis that the genetic background of the host is involved in *CCL2* production and that this chemokine is implicated in promoting metabolic disturbances and sub-clinical atherosclerosis in HIV-infected patients.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Host genetic factors influence the individual's susceptibility to HIV infection, the response to antiretroviral therapy and the duration of the AIDS-free survival period. Particular attention has been focused on the role of virus co-receptors and their ligands but the crucial role of other cytokines, mainly chemokines, in leukocyte trafficking and survival has also raised considerable research effort [1–6].

For instance, in genetically modified mice, plasma concentration of CC-chemokine ligand 2 or *CCL2* (also called monocyte chemoattractant protein-1, or MCP-1) is important for the integration of endocrine and metabolic signals which are highly influenced by inflammatory or infectious stimuli [7–9]. It is likely that a chronic inflammatory stress could impinge quite heavily on the overall regulation of the *CCL2* gene. We, and others, have previously shown that, in HIV-infected patients, plasma *CCL2* concentrations and/or the *CCL2* –2578 genetic variant are major factors determining the course of several and apparently unrelated clinical manifes-

tations of the disease [10–13] (for review, see Ref. [14]). This is probably because regulation of the *CCL2* gene is complex and requires the assembly of multiple regulatory transcription factors with established roles in the overall control of cellular metabolism. Regulatory regions for this gene include domains for inflammatory tumour necrosis factor (TNF)-inducible enhancer [15], for C/EBP $\beta$ , a member of the CCAAT/enhancer binding protein family of transcription factors [16], and for C/EBP $\beta$  homologous protein (CHOP) [17]. All are implicated in *CCL2* regulation and provide a link between *CCL2* promoter activity and factors such as metabolic stress and visceral adipose tissue distribution [15–19].

With the rationale that the cross-talk between metabolism and inflammation could have important clinical implications, we have conducted, in a HIV-infected population, an analysis of *CCL2* genetic variations and its relation to plasma levels of MCP-1, metabolic traits (i.e. lipid profile, insulin resistance and obesity) and sub-clinical atherosclerosis in a case–control, cross-sectional study.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Participants and eligibility

All procedures were approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitari Sant Joan de Reus. The patients provided

\* Corresponding author. Address: Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Sant Joan, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain. Fax: +34 977 319 984.

E-mail address: [quinavir@gmail.com](mailto:quinavir@gmail.com) (C. Alonso-Villaverde).



fully-informed consent and anonymity was guaranteed. A group of HIV-infected patients ( $n = 287$ ) who agreed to participate were drawn from among those attending our outpatient clinic. Excluded were those aged  $<18$  years, those having AIDS-related complications at the commencement of the study and those reporting an ancestry and/or geographic origin different from that of the control group. The control group consisted of non-infected individuals ( $n = 796$ ) participating in other population-based studies (HOMFOL and GENUP studies) and are representative of the general population in our geographic area. Criteria for inclusion consisted of age greater than 18 years and the absence of acute disease or clinical signs of inflammation. Subjects with clinical or analytical evidence of renal insufficiency, major liver disease, neoplasia or neurological disorders were excluded. The details of the control group have been described elsewhere [20].

## 2.2. Measurements

A detailed clinical record was taken from each individual and a thorough physical examination was performed at interview. Data on age, gender and body mass index (BMI; defined as the weight in kilograms divided by the square of the height in metres) were collected. Fasting serum glucose, insulin, cholesterol and triglycerides were measured with the LXi 725-Synchron (Beckman Coulter, Fullerton, California, USA) automatic analyser using enzymatic assays or chemiluminescent immunoassays. HDL-cholesterol levels were measured as described [21]. The LDL-cholesterol concentration was calculated using the Friedewald formula [22]. Insulin resistance was estimated by using the homeostasis model assessment index (HOMA-IR), calculated as fasting glucose (in mmol/L) times fasting insulin (in mIU/L) divided by 22.5 [23]. The plasma concentration of CCL2 was measured with an enzyme-linked immunosorbent assay (Human MCP-1 ELISA, PeproTech, London, UK).

In the group of HIV-infected patients, we also collated pertinent clinical and laboratory data including hepatitis-C virus (HCV) co-infection, previous AIDS-related diseases, the history of opportunistic infections, the HIV-1 RNA viral load, the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte counts, and the presence of lipodystrophy (defined as the presence of body-fat changes that could be clearly recognized by the patients themselves and confirmed by the physician; these changes included subcutaneous lipoatrophy and central obesity) [24]. To further explore the effect of prescribed drugs, a subset of these patients who had the relevant information in their clinical notes, was selected to provide data on the course of plasma lipid profile changes with treatment. The treatments being employed were either protease inhibitor (PI)-based antiretroviral combined treatment regimen ( $n = 117$ ) or efavirenz ( $n = 99$ ).

## 2.3. Genotyping

DNA was extracted by a standard phenol–chloroform procedure. We selected six single nucleotide polymorphisms (SNP) spanning the CCL2 gene from those in the National Center for Biotechnology Information SNP public database (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). The criteria defining the haplotype blocks were previously established in samples obtained from the Framingham Heart Study [25]. We used the SNPlex genotyping system as previously described [26] and the genotyped SNPs were:  $-2835$  C/A (rs2857654),  $-2578$  A/G (also named  $-2518$ , rs1024611),  $-2136$  A/T (rs1024610),  $-1811$  A/G (rs3760399),  $-927$  G/C (rs3760396) and  $+3726$  T/C (rs2530797); the names reflect their distance, in nucleotides, from the translational start point. **Supplementary data** Table 1 provides genotyping information for all polymorphisms.

## 2.4. Ultrasound assessment

The carotid and femoral ultrasound measurements were performed in 212 patients using a Logiq 700 Expert apparatus from GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK) with an ultrasound probe of 7–10 MHz according to a previously standardised protocol. These investigators were blinded with respect to the results of the other measured variables. Digitally recorded measurements of the intima-media thickness (IMT) were made in the common carotid artery (1 cm proximal to the bifurcation), the carotid bulb (in the bifurcation), the internal carotid artery (1 cm distal to the bifurcation) and the common femoral artery. All IMT measurements were performed at these predefined points using the image processing software AnaliSYS (Soft Imaging System, Münster, Germany). Measurements on each arterial segment were averaged to define those patients with and those without significant alterations [12].

## 2.5. Statistical analysis

Standard methods (Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk Test) were used to check for normality of distribution of the variables and, when necessary, values were logarithmically transformed. Non-parametric test were used for univariate analysis when appropriate. The Chi-square test was used for comparison of categorical variables, and multiple regression models were used to analyse the associations between clinical variables and the haplotypes, genotypes and alleles. Haplotypes were estimated using the expectation–maximisation algorithm (HelixTree, version 5.0.7, Golden Helix). Since each subject has two haplotypes (diplotype; one on each chromosome) and diplotype homozygosity had very low frequencies to obtain reliable conclusions, we doubled the data considering the haplotype as the unit of analysis. The analysis of linkage disequilibrium (LD), Hardy–Weinberg equilibrium deviations and  $D'$  values were calculated with the same software. Data are presented as means with the standard error of the mean in parenthesis (SEM) except when otherwise indicated. We performed univariate and multivariate analysis to evaluate the variables that were associated to CCL2 concentration. In the multivariate analysis we included in the model age, gender, BMI, lipid profile, glucose and insulin levels and HIV-related variables (i.e. HIV-1 RNA viral load, CD4<sup>+</sup> T lymphocyte counts, antiretroviral treatment scheme, presence of lipodystrophy and co-infection by HCV). Patients virologically uncontrolled (HIV-1 RNA viral load  $>200$  copies/mL) were excluded. To analyse the course of the lipid profile changes with treatment we used the multivariate linear general model while adjusting the models by the same variables listed previously.

## 3. Results

Demographic and clinical characteristics and laboratory measurements of both groups as well as data only applicable to the HIV-infected patients are summarised in Table 1. HIV-infected patients were younger and leaner but showed significant lipid and glucose concentration alterations as compared with healthy participants. Age and gender distribution did not show a significant impact on the genotype distribution and were not further considered. In most patients, the risk factor for HIV was intravenous drug abuse (60.4%) followed by heterosexual contact (30.7%) and male homosexual contact (8.9%). Mean time of serologic evidence of the infection was 4.29 (0.2) years. There were 175 patients co-infected with HCV, and 73 had severe lipodystrophy.

### 3.1. Genotypes, haplotypes and plasma CCL2 concentration

The genotype and allele frequencies of the selected CCL2 polymorphisms showed no significant variation between groups (see

**Table 1**  
Main clinical characteristics in the control group and HIV-infected patients.

	Control group (n = 796)	HIV-infected patients (n = 287)	p Values
Gender, male (%)	393 (48)	185 (63)	0.09
Age (years)	44.6 (0.5)	38.8 (0.48)	<0.0001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27 (0.18)	22.9 (0.25)	0.001
Total cholesterol (mmol/L)	5.26 (0.03)	4.88 (0.09)	<0.0001
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.5 (0.01)	1.17 (0.03)	<0.0001
VLDL-cholesterol (mmol/L)	0.57 (0.01)	0.84 (0.05)	<0.0001
LDL-cholesterol (mmol/L)	3.15 (0.03)	2.75 (0.07)	<0.0001
Triglycerides (mmol/L)	1.3 (0.03)	2.68 (0.3)	<0.0001
Glucose (mmol/L)	4.96 (0.05)	5.38 (0.07)	<0.0001
Insulin (pmol/L)	64.6 (5.4)	71 (4.8)	0.3
HOMA-IR	1.1 (0.07)	1.4 (0.1)	0.055
CCL2 (pg/mL)	61.54 (1.97)	71.57 (2.8)	0.003
Undetectable HIV-1 viral load,* n (%)	n.a.	192 (65)	–
CD4 <sup>+</sup> T cell count (cells/μL)	n.a.	447 (16)	–
CD8 <sup>+</sup> T cell count (cells/μL)	n.a.	1084 (34)	–
Treatment scheme, n (%)			
NNRTI	n.a.	135 (46)	–
PI/r	n.a.	184 (63)	–
NRTI	n.a.	216 (73)	–

Values are the mean and the standard deviations (SD) of the mean, unless otherwise indicated.

BMI: body mass index; HOMA-IR: homeostasis model assessment-estimated insulin resistance; NNRTI: non-nucleoside analogues reverse transcriptase inhibitors; NRTI: nucleoside analogues reverse transcriptase inhibitors; PI/r: protease inhibitors/ritonavir boosted; n.a.: not applicable; \*Limit of detection: 40 copies/mL.

Table 2), but the plasma CCL2 concentration was significantly higher in HIV-infected patients. The genotype frequencies for each allele followed the Hardy–Weinberg equilibrium in both groups. Except for the relationship between polymorphisms –1811 A/G and –927 G/C, all the CCL2 polymorphisms were in linkage disequilibrium (LD) with each other, as graphically represented in Fig. 1A.

The expectation–maximisation algorithm revealed 9 haplotypes for healthy participants and 11 for the group of HIV-infected patients, but only 6 haplotypes (H1 through H6, from higher to lower estimated frequencies; see Fig. 1B) were present in more than the 5% of individuals, and accounted for more than 98% of the population in both groups. The lack of LD between –1811 A/G and –927

**Table 2**  
Genotype distribution of the CCL2 polymorphisms in the control group and HIV-infected patients.

Polymorphism		Control group (n = 796) n (%)	HIV-infected patients (n = 287) n (%)
–2835 C/A rs2857654	CC	450 (56.7)	155 (54.0)
	CA	293 (36.9)	116 (40.4)
	AA	51 (6.4)	16 (5.6)
–2578 A/G rs1024611	AA	454 (57.0)	155 (54.0)
	AG	292 (36.7)	118 (41.1)
	GG	50 (6.3)	14 (4.9)
–2136 A/T rs1024610	AA	493 (62.0)	179 (63.0)
	AT	259 (32.6)	88 (31.0)
	TT	43 (5.4)	17 (6.0)
–1811 A/G rs3760399	AA	712 (89.4)	253 (88.2)
	AG	84 (10.6)	34 (11.8)
	GG	–	–
–927 G/C rs3760396	GG	564 (70.9)	208 (72.5)
	CG	217 (27.3)	73 (25.4)
	CC	14 (1.8)	6 (2.1)
+3726 T/C rs2530797	TT	263 (33.1)	103 (35.9)
	TC	376 (47.3)	126 (43.9)
	CC	156 (19.6)	58 (20.2)

G/C and the different D' values obtained in our population resulted in a different haplotype estimation percentage compared with previous data [20]. Although differences in LD are common even between nearby populations, these may be relevant for further interpretation of the results. Consequently, data were included only after full concordance of at least two separate measurements. Thirty diplotypes configurations were estimated but only eight had frequencies higher than 5% (i.e. H1/H1; 5.3%, H3/H1; 9.4%, H1/H2; 11.3%, H1/H4; 8.6%, H3/H2; 9.3%, H2/H2; 5.3%, H3/H4; 5.4%, H2/H4; 6%). The configuration of diplotypes showed that there were not differences between groups in homozygosis for the estimated haplotypes except for H5 (2.4% in patients and 0.3% in controls; p = 0.005).

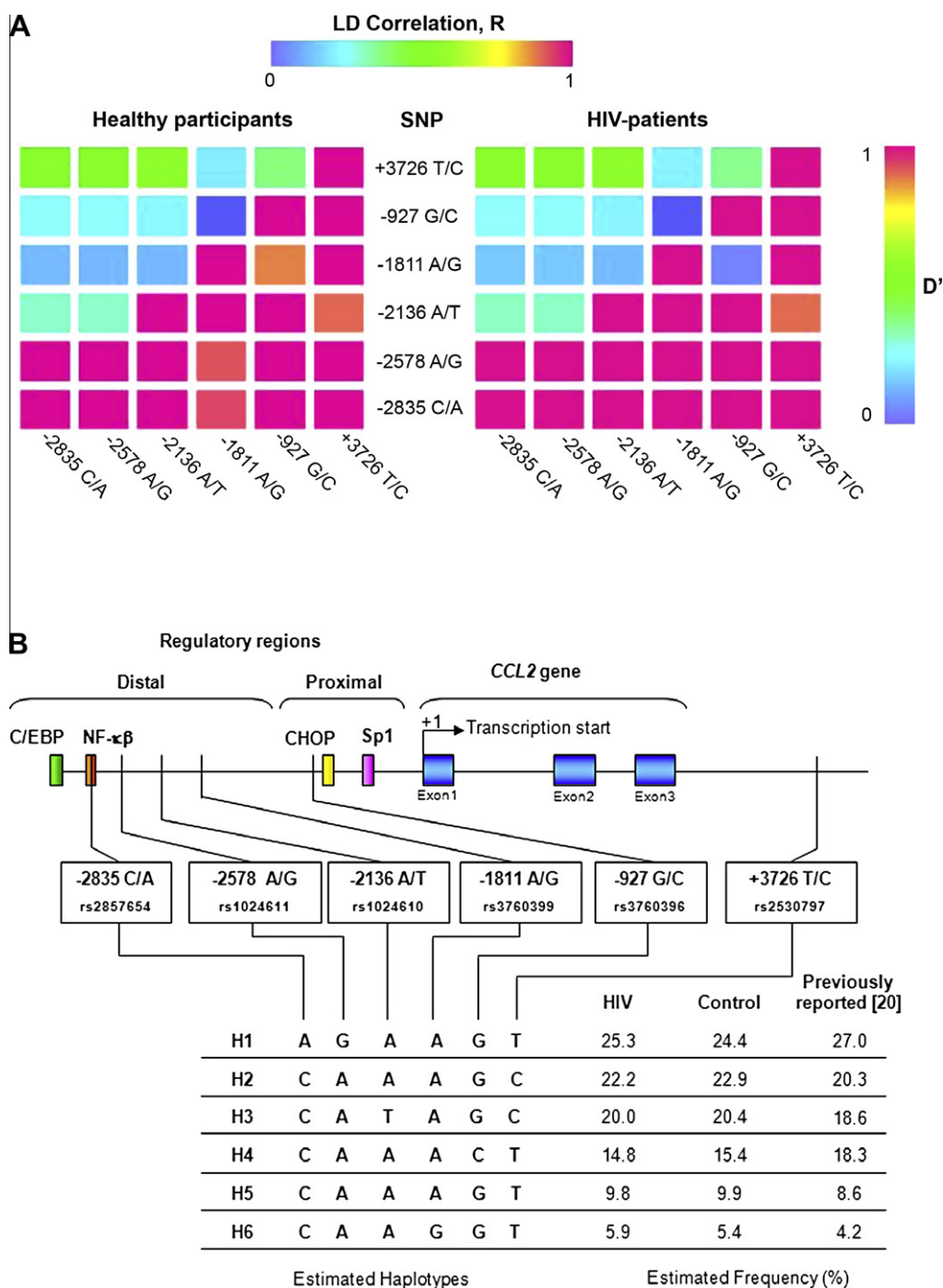
There were no statistically significant associations between plasma CCL2 concentrations and genotypes in healthy participants. HIV-infected patients showed consistently higher plasma CCL2 concentrations but the differences were only significant in carriers of the –2835 AA (p < 0.001), –2578 GG (p < 0.001) and –1811 AG (p < 0.0001) polymorphisms (see Fig. 2A). There were no differences in plasma CCL2 concentrations in controls with respect to the haplotype distribution. In HIV-infected patients, however, carriers of H1, H2 and H5 haplotypes had higher plasma CCL2 concentrations than carriers of H3, H4 and H6 in relation to their corresponding controls (see Fig. 2B and Supplementary data Table 2). The distribution of the CCL2 alleles among the haplotypes was similar in both groups. We found significant associations in relation to measured variables only in HIV-infected patients, indicating a prominent role for factors related to the infection itself and the probable inflammatory stimuli. When a multivariate analysis was performed in all participants, healthy and HIV-infected group, only CAAGGT haplotype [B = 17 (6.4), β = 0.13, p = 0.008] and to be infected by the HIV [B = 14 (4.1), β = 0.18, p = 0.001] significantly contributed to explain serum CCL2 concentration. Similarly, when a multivariate analysis was conducted only in HIV-infected group, circulating levels of CCL2 were also associated with the CAAGGT haplotype [B = 35.1 (12.8), β = 0.29, p = 0.007].

### 3.2. Blood constituents and CCL2 gene variants

There were no differences in the distribution of haplotypes and/or genotypes in HIV-infected patients in relation to any of the categorical variables measured or with respect to the HIV-1 RNA viral load, the CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T lymphocyte count and the frequency of severe lipodystrophy. HIV-infected patients had higher plasma glucose and lower HDL-cholesterol concentrations than healthy participants (see Table 1). The only genotype-related difference was found in relation to the +3726 T/C polymorphism. Carriers of the genotype +3726 CC had lower plasma glucose and higher HDL-cholesterol concentrations than those with the TC and TT genotypes (p < 0.008 for each comparison). Such differences remained significant when analysed in relation to all the other genotypes (p < 0.05).

When segregated with respect to haplotypes, univariate and multivariate analysis did not identify any significant distribution of values in healthy participants in relation to glucose metabolism or to BMI. However, in HIV-infected patients, we found significant variations in measured variables in relation to the haplotype distribution. Such differences were confined to carriers of the H1, H2 and H5 haplotypes, i.e. those with higher plasma CCL2 concentration (see Fig. 2C and Supplementary data Table 2). Carriers of the H5 haplotype showed the less favourable combination of disturbances in biomarkers of glucose metabolism.

We did not observe significant variation among haplotypes with respect to lipid disturbances, probably as a consequence of the well-documented effects of the drugs prescribed. We found that, in H1 haplotype carriers, plasma triglyceride concentration was positively associated with the use of protease inhibitors (p = 0.001) and, as



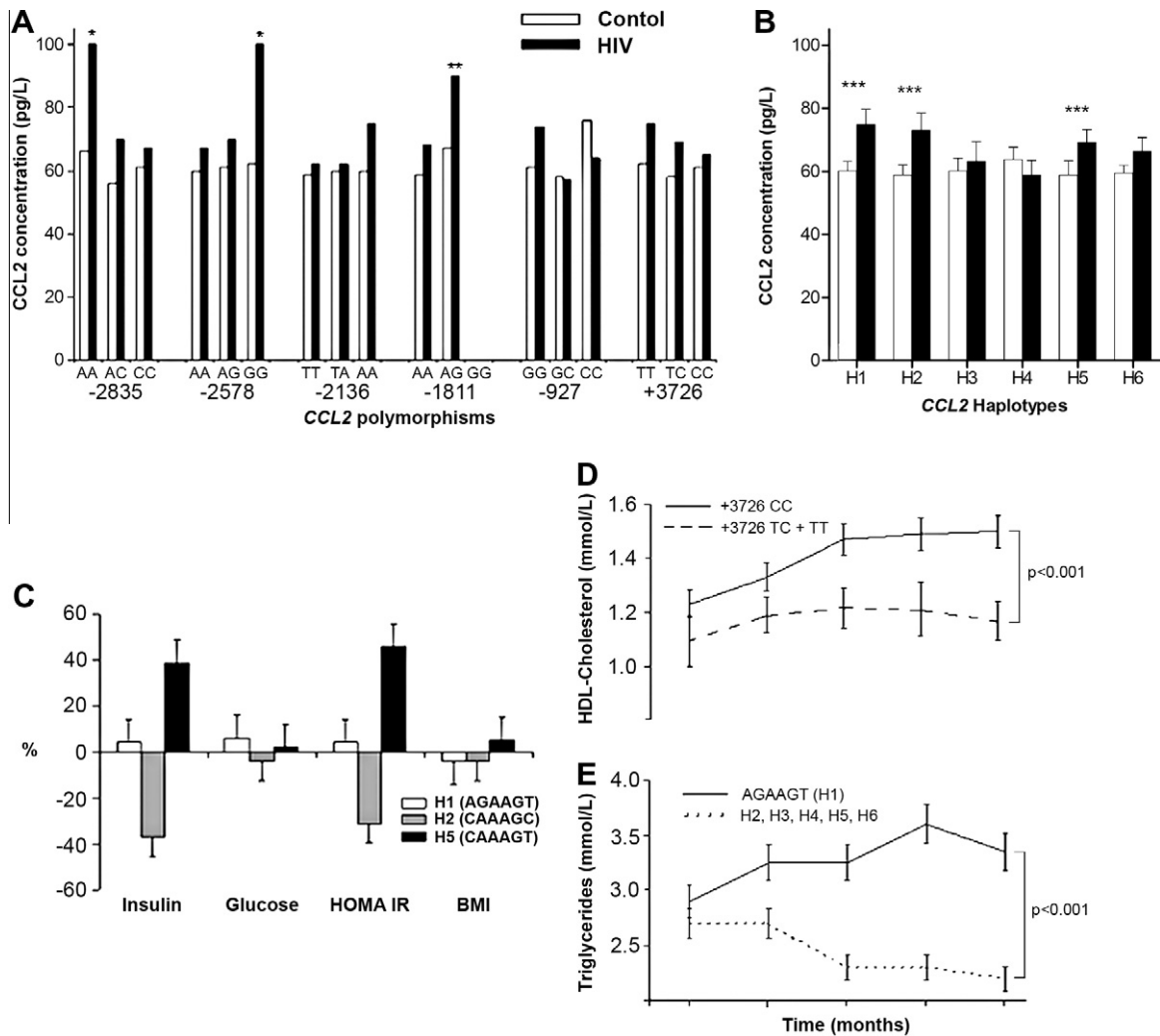
**Fig. 1.** (A) Linkage disequilibrium maps of the *CCL2* gene. The panels represent the linkage disequilibrium (LD) correlation and  $D'$  values (a statistical measure of LD). The colours of squares represent the different degrees of values according to the colour scale. (B) Genomic organization and location of polymorphic variations in *CCL2* gene. *CCL2* lies on long arm of chromosome 17 in cluster with other chemokine genes. It has 3 exons extending over  $\approx 2000$  bp. It is known to have both distal and proximal regulatory elements important for cytokine-induced and constitutive activity, respectively. Polymorphisms studied here span the gene and are named for their distance in nucleotides from translational start point. Haplotypes were estimated using the expectation–maximisation algorithm (HelixTree, version 5.0.7, Golden Helix). Haplotypes with an estimated frequency  $<5\%$  were not considered. Please note that regarding polymorphism nomenclature, those nucleotides presented by McDermott et al. [20] are in parentheses and superscript in positions  $-927$  and  $+3726$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

such, we entered the different treatment schemes as a possible confounding factor in the analyses. To further explore this point, we assessed the course of lipid changes in patients who had been treatment-naïve and subsequently treated with either protease inhibitors or efavirenz. The effect of efavirenz on lipid metabolism was statistically negligible. Data on patients treated with protease inhibitors showed that the course-of-change in the HDL-cholesterol concentration was predictable and segregated with the  $+3726$  CC

genotype, and with hypertriglyceridaemia being more likely in carriers of the H1 haplotype (see Fig. 2D and E).

### 3.3. *CCL2* gene variants and sub-clinical atherosclerosis

Data were analysed using the presence or absence of significant sub-clinical atherosclerosis as an outcome measurement. Sub-clinical atherosclerosis was defined by previously-described criteria



**Fig. 2.** Impact of *CCL2* gene variants on serum CCL2 concentrations and metabolic parameters in HIV-infected patients and control subjects. (A) CCL2 concentrations (pg/L) vary according to *CCL2* polymorphisms. (B) CCL2 concentrations (pg/L) vary according to *CCL2* haplotypes. (C) Influence of AGAAGT (opened bars), CAAAGC (grey bars) and CAAAGT (closed bars) haplotypes on variables related to glucose metabolism or BMI (see Supplementary data Table 2). (D) Impact of +3726 T/C genotype on HDL-cholesterol concentrations course in HIV-infected patients treated with scheme based on protease inhibitors. CC homozygote patients are represented with a black line ( $p < 0.01$ ). (E) Impact of AGAAGT haplotype on triglyceride concentration in the course of HIV-infected patients receiving scheme based on protease inhibitors. The black line represents the AGAAGT haplotype. \* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.05$ .

[12] based on the intima-media thickness (IMT) and/or the presence of plaques. We found deleterious effects of the  $-2835$  A and  $-2578$  G alleles and a protective effect of the  $+3726$  C allele in relation to the presence of atherosclerosis (see Fig. 3 and Supplementary data Table 2). Multivariate analyses showed that the haplotypes H1, H2 and H5 were significantly associated with arterial lesions. As expected, carriers of the H1 haplotype showed a higher proportion of affected patients than non-affected; albeit the difference was only statistically significant with respect to the femoral artery. Carriers of the H5 haplotype also showed a significantly higher proportion of affected patients, mainly with respect to the carotid artery. Conversely, carriers of the H2 haplotype, which also showed high plasma CCL2 concentration, were relatively protected and the proportion of non-affected patients was higher than those with significant lesions. Curiously, this was associated with lower insulin resistance, lower BMI and less deleterious metabolic disturbances.

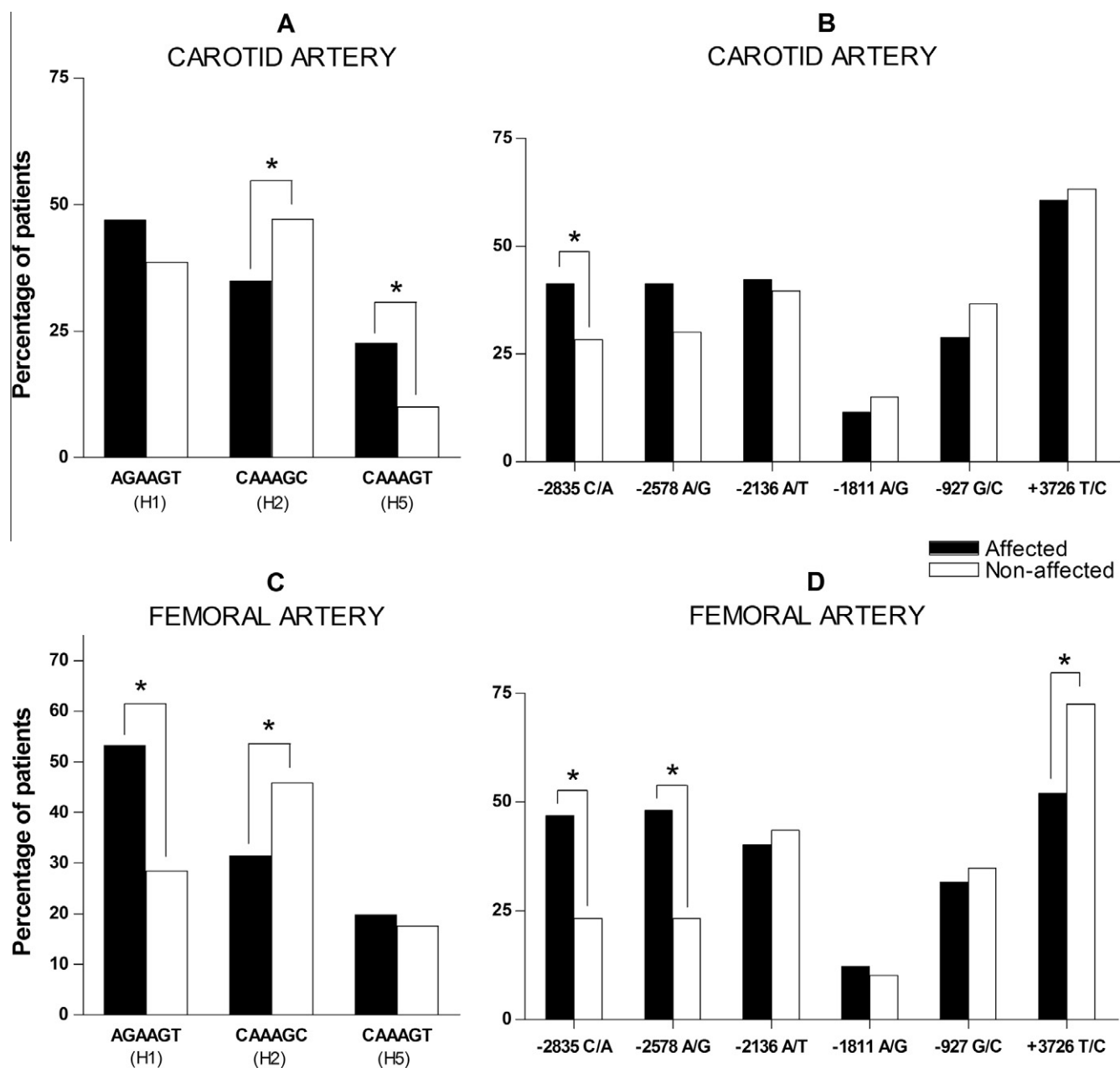
#### 4. Discussion

There were no statistically significant differences among control individuals and HIV-infected patients with respect to the genotype

and allele frequencies of the selected *CCL2* polymorphisms. Despite this similarity, we observed different phenotypes among the HIV-infected patients. This suggests that the HIV-infection itself, or associated factors, could induce a differential response in the expression of the *CCL2* gene. As schematically presented in Fig. 4, only some haplotypes such as H1, H2 and H5 (representing approximately the 50% of the population) respond to the inflammatory stimuli with and with higher plasma CCL2 concentrations. This was expected for the H1, which is mainly defined by the well-documented  $-2578$  G allele, but not for the other two haplotypes, suggesting that other factors could also be implicated in regulating plasma CCL2 levels. Recently, Schnabel et al. found a single genetic variant, *DARC* rs12075 (Asp42Gly), that explains approximately 20% of the variation in serum MCP-1 concentration [27].

Among HIV-infected patients, carriers of H1 haplotype showed a higher proportion of hyperinsulinaemia, higher plasma glucose concentration, hypertriglyceridaemia and sub-clinical atherosclerosis. This is in accordance with previous data assessing the role of the  $-2578$  G allele [12]. Patients carrying the H5 haplotype also had the less favourable metabolic scenario including high insulin resistance and BMI, and which could explain the higher proportion of these patients having sub-clinical atherosclerosis. Therefore, it





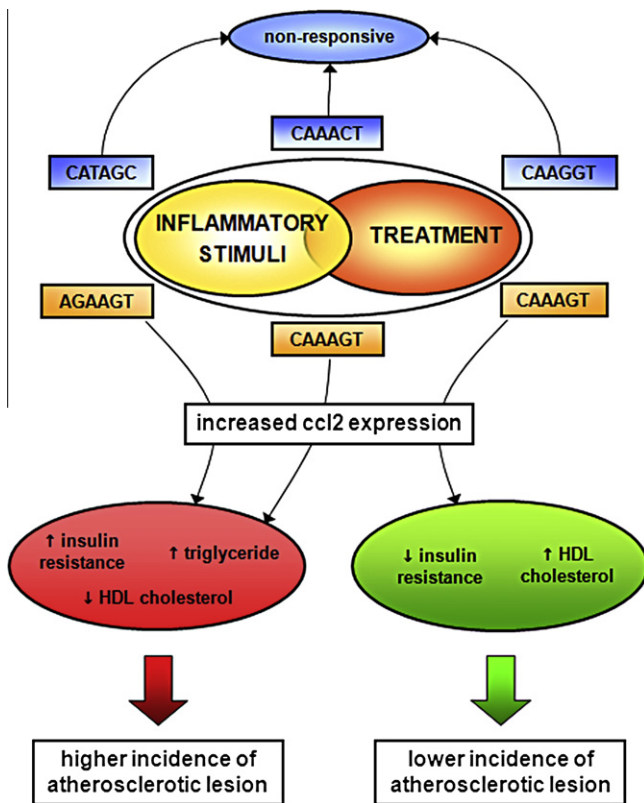
**Fig. 3.** Percentage of HIV-infected patients having sub-clinical atherosclerosis (affected ■) and without sub-clinical atherosclerosis (non-affected □) segregated with respect to *CCL2* haplotypes (A) and genotypes (B) in carotid artery; or *CCL2* haplotypes (C) and genotypes (D) in femoral artery. Logistic regression model was applied to assess association of carotid and femoral atherosclerosis with the *CCL2* gene variants (see Supplementary data Table 2). \* $p < 0.05$ .

could be argued that these manifestations may be the effect of higher plasma *CCL2* concentrations [28], but carriers of the H2 haplotype, despite similar plasma *CCL2* values, had lower atheromatous lesions in carotid and femoral arteries than carriers of non-H2 haplotype. Therefore, there may be a protective effect of this particular haplotypes, characterised by the +3726 C allele, since it is associated with lower BMI values, conserved glucose metabolism. Although influenced by treatment [29,30], this allele is clearly associated with higher HDL-cholesterol concentrations. Additional clinical data may also support a close, and protective, relationship between low BMI, lower insulin resistance and higher HDL-cholesterol levels in HIV-infected patients [31,32].

An unambiguous interpretation of our findings regarding lipoprotein changes is complicated by the effect of the different treatment schemes employed in our patients. However, we found a

consistent relationship between hypertriglyceridaemia and high plasma *CCL2* concentrations in untreated patients [14], as has also been observed in other scenarios of inflammation and in patients with the metabolic syndrome [33–35]. A similar reasoning may be applied to the relationship between insulin resistance and high plasma *CCL2* concentrations [36–38] which are concordant with findings in mice [7,8].

We acknowledge that our observations may be limited to certain areas. Proven *CCL2* mutations have been inconsistent in different studies [39,40], there are clear differences in the frequency of the SNPs studied among different populations (see Table 3) and consequently the haplotype structure may differ among populations. Moreover, it is well-documented that haplotype diversity may be found even among neighbouring populations [41,42]. Other possible sources of errors are the possibility of population



**Fig. 4.** Host *CCL2* haplotypes induce a differential metabolic-parameter response in HIV-infected patients. Some haplotypes (H1, H2 and H5) respond to the HIV-related outcomes with higher plasma *CCL2* concentrations. However, only H1 (AGAAGT) and H5 (CAAAGT) haplotypes are related to both pro-atherogenic metabolic abnormalities and premature sub-clinical atherosclerosis, but not for the H2 (CAAAGC) haplotype; an indication of the far-from-understood complexity of the *CCL2* gene regulation.

stratification and the absence of family-tree information to establish phase. Based on our matching procedure and on previous analyses in unlinked SNPs [43], we believe that the risk of stratification

**Table 3**

Summary of the frequencies of *CCL2* polymorphisms in different populations (as presented at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=human+ccl2>).

Polymorphism	This study <sup>a</sup> (%)	European (%)	African American (%)	Asian (%)	Sub-Saharan African (%)
-2835 A/C rs2857654	AA	6	6		
	AC	37	44		
	CC	57	50		
-2578 A/G rs1024611	AA	57	75	60	90
	AG	37	25	20	10
	GG	6	2	20	–
-2136 T/A rs1024610	AA	62	88	87	90
	TA	33	12	9	10
	TT	5	2	4	–
-1811 A/G rs3760399	AA	89	97	91	100
	AG	11	3	8	–
	GG	–	1	1	–
-927 G/C rs3760396	GG	2	–	1	–
	CG	27	5	15	–
	CC	71	55	84	100
+3726 T/C rs2530797	TT	33	65	55	80
	TC	47	30	40	20
	CC	20	15	5	–

<sup>a</sup> Detailed data in Table 2.

is relatively low in this study. Also, phased haplotypes and inferred haplotypes have been previously shown to be similar in this particular genomic region [44].

Despite these obvious limitations, our data indicate that the genetic background of the host could be involved in *CCL2* production and that this chemokine may contribute to the metabolic disturbances and the presence of sub-clinical atherosclerosis in HIV-infected patients. Our findings have important clinical implications since current medications for reducing coronary disease mortality and balancing metabolic alterations are effective and may be particularly indicated in patients who have ultrasound evidence of arterial disease.

#### Acknowledgments

The study was financially supported by grants from *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS PI08/1032, PI05/1606 and PI05/1607). G.A., R.B. and A.R. are recipients of grants from *Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu*. Fernando Rodríguez is a visiting scientist from the *Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Industrial de Santander*, Bucaramanga, Colombia. The authors are indebted to Dr. Blai Coll for his invaluable scientific support and M<sup>a</sup> Asunción González for her nursing assistance.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.cyto.2010.05.008.

#### References

- [1] Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, Cooke G, Dhanda R, Mummidi S, et al. HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13795–800.
- [2] Carrington M, Dean M, Martin MP, O'Brien SJ. Genetics of HIV-1 infection: chemokine receptor CCR5 polymorphism and its consequences. *Hum Mol Genet* 1999;8:1939–45.
- [3] Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, et al. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* 1997;277:959–65.
- [4] Arenzana-Seisdedos F, Parmentier M. Genetics of resistance to HIV infection: role of co-receptors and co-receptor ligands. *Semin Immunol* 2006;18:387–403.
- [5] Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 1996;35:3362–7.
- [6] Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, Ashton LJ, Benfield TL, Buchbinder SP, et al. Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: an international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med* 2001;135:782–95.
- [7] Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006;116:1494–505.
- [8] Rull A, Escola-Gil JC, Julve J, Rotllan N, Calpe-Berdiel L, Coll B, et al. Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism. *Exp Mol Pathol* 2007;83:361–6.
- [9] Bielinski SJ, Pankow JS, Miller MB, Hopkins PN, Eckfeldt JH, Hixson J, et al. Circulating MCP-1 levels shows linkage to chemokine receptor gene cluster on chromosome 3: the NHLBI family heart study follow-up examination. *Genes Immun* 2007;8:684–90.
- [10] Vilades C, Broch M, Plana M, Domingo P, Alonso-Villaverde C, Pedrol E, et al. Effect of genetic variants of CCR2 and CCL2 on the natural history of HIV-1 infection: CCL2 –2518GG is overrepresented in a cohort of Spanish HIV-1-infected subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;44:132–8.
- [11] Coll B, Alonso-Villaverde C, Parra S, Rabassa A, Martorell L, Joven J, et al. Influence of a monocyte chemoattractant protein 1 mutated allele on the response to protease inhibitor-based antiretroviral therapy. *HIV Med* 2006;7:356–60.

- [12] Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, Montero M, Calvo N, Tous M, et al. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation* 2004;110:2204–9.
- [13] Coll B, van Wijk JP, Parra S, Castro Cabezas M, Hoepelman IM, Alonso-Villaverde C, et al. Effects of rosiglitazone and metformin on postprandial paraoxonase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human immunodeficiency virus-infected patients with lipodystrophy. *Eur J Pharmacol* 2006;544:104–10.
- [14] Coll B, Alonso-Villaverde C, Joven J. Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: is there room for an additional biomarker? *Clin Chim Acta* 2007;383:21–9.
- [15] Teferedegne B, Green MR, Guo Z, Boss JM. Mechanism of action of a distal NF-kappaB-dependent enhancer. *Mol Cell Biol* 2006;26:5759–70.
- [16] Spooner CJ, Guo X, Johnson PF, Schwartz RC. Differential roles of C/EBP beta regulatory domains in specifying MCP-1 and IL-6 transcription. *Mol Immunol* 2007;44:1384–92.
- [17] Sekine O, Nishio Y, Egawa K, Nakamura T, Maegawa H, Kashiwagi A. Insulin activates CCAAT/enhancer binding proteins and proinflammatory gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2002;277:36631–9.
- [18] Kodama K, Nishio Y, Sekine O, Sato Y, Egawa K, Maegawa H, et al. Bidirectional regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene at distinct sites of its promoter by nitric oxide in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289:C582–90.
- [19] Sutton BS, Langefeld CD, Campbell JK, Haffner SM, Norris JM, Scherzinger AL, et al. Genetic mapping of a 17q chromosomal region linked to obesity phenotypes in the IRAS family study. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:1433–41.
- [20] Ferré N, Camps J, Fernández-Ballart J, Arija V, Murphy MM, Ceruelo S, et al. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional and lifestyle factors in general population. *Clin Chem* 2003;49:1491–7.
- [21] Simó JM, Castellano I, Ferré N, Joven J, Camps J. Evaluation of a homogeneous assay for high-density lipoprotein cholesterol: limitations in patients with cardiovascular, renal, and hepatic disorders. *Clin Chem* 1998;44:1233–41.
- [22] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
- [23] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–9.
- [24] Martínez E, Mocroft A, García-Viejo MA, Pérez-Cuevas JB, Blanco JL, Mallolas J, et al. Risk of lipodystrophy in HIV-1 infected patients treated with protease inhibitors: a prospective cohort study. *Lancet* 2001;357:592–8.
- [25] McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, Keaney JF, et al. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2005;112:1113–20.
- [26] Tobler AR, Short S, Andersen MR, Paner TM, Briggs JC, Lambert SM, et al. The SNPlex genotyping system: a flexible and scalable platform for SNP genotyping. *J Biomol Tech* 2005;16:398–406.
- [27] Schnabel RB, Baumert J, Barbalić M, Dupuis J, Ellinor PT, Durda P, et al. Duffy antigen receptor for chemokines (Darc) polymorphism regulates circulating concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and other inflammatory mediators. *Blood* 2009. doi:10.1182/blood-2009-05-221382.
- [28] Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7265–70.
- [29] van Leth F, Phanuphak P, Stroes E, Gazzard B, Cahn P, Raffi F, et al. Nevirapine and efavirenz elicit different changes in lipid profiles in antiretroviral-therapy-naive patients infected with HIV-1. *PLoS Med* 2004;1:e19.
- [30] Alonso-Villaverde C, Coll B, Gomez F, Parra S, Camps J, Joven J, et al. The efavirenz-induced increase in HDL-cholesterol is influenced by the multidrug resistance gene 1 C3435T polymorphism. *AIDS* 2005;19:341–2.
- [31] Freedman DS, Kahn HS, Mei Z, Grummer-Strawn LM, Dietz WH, Srinivasan SR, et al. Relation of body mass index and waist-to-height ratio to cardiovascular disease risk factors in children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. *Am J Clin Nutr* 2007;86:33–40.
- [32] Turner ST, Peyser PA, Kardias SL, Bielak LF, Sheedy 3rd PF, Boerwinkle E, et al. Genomic loci with pleiotropic effects on coronary artery calcification. *Atherosclerosis* 2006;185:340–6.
- [33] Asanuma Y, Chung CP, Oeser A, Shintani A, Stanley E, Raggi P, et al. Increased concentration of proatherogenic inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to cardiovascular risk factors. *J Rheumatol* 2006;33:539–45.
- [34] Sedlmeier EM, Grallert H, Huth C, Lowel H, Herder C, Strassburger K, et al. Gene variants of monocyte chemoattractant protein 1 and components of metabolic syndrome in KORA S4, Augsburg. *Eur J Endocrinol* 2007;156:377–85.
- [35] Ng MC, So WY, Lam VK, Cockram CS, Bell GI, Cox NJ, et al. Genome-wide scan for metabolic syndrome and related quantitative traits in Hong Kong Chinese and confirmation of a susceptibility locus on chromosome 1q21-q25. *Diabetes* 2004;53:2676–83.
- [36] Simeoni E, Hoffmann MM, Winkelmann BR, Ruiz J, Fleury S, Boehm BO, et al. Association between the A –2518G polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 gene and insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2004;47:1574–80.
- [37] Noor MA. The role of protease inhibitors in the pathogenesis of HIV-associated insulin resistance: cellular mechanisms and clinical implications. *Curr HIV/AIDS Rep* 2007;4:126–34.
- [38] Maruyama-Furuta N, Yano Y, Gabazza EC, Suematsu M, Matsumoto K, Akatsuka H, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 promoter –2518 polymorphism is associated with post-challenge insulin and glucose levels in non-diabetic Japanese subjects. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;78:208–10.
- [39] Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:344–8.
- [40] Hughes AL, Yeager M. Coevolution of the mammalian chemokines and their receptors. *Immunogenetics* 1999;49:115–24.
- [41] Goldstein DB, Weale ME. Population genomics: linkage disequilibrium holds the key. *Curr Biol* 2001;11:R576–9.
- [42] Vitart V, Carothers AD, Hayward C, Teague P, Hastie ND, Campbell H, et al. Increased level of linkage disequilibrium in rural compared with urban communities: a factor to consider in association-study design. *Am J Hum Genet* 2005;76:763–72.
- [43] Murphy MM, Vilella E, Ceruelo S, Figuera L, Sanchez M, Camps J, et al. The MTHFR C677T, APOE, and PON55 gene polymorphisms show relevant interactions with cardiovascular risk factors. *Clin Chem* 2002;48:372–5.
- [44] Clark VJ, Dean M. Characterisation of SNP haplotype structure in chemokine and chemokine receptor genes using CEPH pedigrees and statistical estimation. *Hum Genomics* 2004;1:195–207.

## **5. Discussió General**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

La infecció crònica pel VIH, ha esdevingut un paradigma de model fisiopatològic d'estat pro-oxidatiu [140-144] i pro-inflamatori amb complicacions metabòliques que cada cop precisen d'una atenció mèdica més complexa [145]. La disminució de la mortalitat associada a la immunodepressió severa i a les malalties definitòries de SIDA, ha promogut que cada cop els metges especialitzats en el seguiment i tractament d'aquests pacients hagin de tractar les complicacions clíniques degudes als efectes adversos dels fàrmacs antiretrovirals, a l'aparició i coexistència d'altres malalties importants com les hepatopaties víriques, neoplàsies, complicacions renals i òssies, i a una sèrie de trastorns metabòlics relacionats amb alteracions lipídiques i lipoproteiques i amb l'increment de la resistència a la insulina [146,147].

Clàssicament, les partícules HDL únicament eren enteses com a partícules relativament importants en la regulació del metabolisme lipídic degut al seu paper en el transport, recollida, processament i eliminació de l'excés de colesterol i dels lípids oxidats [99,148]. Tanmateix, en condicions d'estrés metabòlic o inflamatori, les partícules HDL poden perdre la seva funcionalitat, i esdevenir partícules no funcionals, i inclús, exhibir efectes pro-inflamatoris i pro-oxidants, que incrementen la quimiotaxi de monòcits [99], i en conseqüència el desenvolupament i progressió de l'aterosclerosi. S'ha demostrat que els ratolins genèticament modificats i susceptibles a desenvolupar aterosclerosi (ratolins deficients amb apolipoproteïna E o ratolins deficients pel receptor de les LDL), presenten un augment de partícules HDL pro-inflamatòries [148,149]. Per tant, les partícules HDL, no únicament extreuen l'excés de colesterol dels teixits perifèrics actuant com a partícules transportadores, sinó que també tenen un paper clau en la regulació dels efectes deleteris associats a un procés inflamatori més o menys persistent.

Recentment, l'estudi de les relacions entre les partícules HDL i el curs de la infecció pel VIH està tenint gran rellevància entre la comunitat científica. L'adaptació d'aquesta lipoproteïna a un estat pro-inflamatori i pro-oxidant crònic, conjuntament amb les alteracions metabòliques associades a la infecció, són aspectes que estan rebent una gran atenció. Les concentracions disminuïdes de colesterol-HDL en els pacients infectats pel VIH és habitual, i s'atribueix als efectes de la teràpia antiretroviral a la qual es troben sotmesos aquests pacients [54]. Tanmateix, els trastorns pro-aterogènics observats durant la infecció no poden ser atribuïts únicament a les baixes concentracions circulants de colesterol-HDL que presenten aquests pacients, sinó també a les modificacions qualitatives que pateixen les partícules HDL. L'estrés oxidatiu i la inflamació pròpies de la infecció pel VIH i la prevalença d'aquest estat

inflamatori contribueix a la pèrdua de l'activitat antiinflamatòria de les HDL en aquests individus. Inclús, s'ha descrit que alguns fàrmacs antiretrovirals podrien promoure canvis beneficiosos en les partícules HDL, induint un augment del transport revers de colesterol i una millora de la capacitat antioxidant [150]. Per tant, és plausible, tal i com demostrem en aquesta Tesi Doctoral, que la infecció per ella mateixa determini un greu impacte en el tamany i composició proteica de les partícules HDL, i que aquests canvis es relacionin directament amb la severitat de la infecció. A més a més, sembla ser, que aquests canvis podrien patir una reversió, almenys parcial, quan s'aplica una correcta teràpia antiretroviral, i per tant, un òptim control immuno-virològic. Per d'altra banda, també mostrem en aquesta Tesi Doctoral, que les determinacions clíniques actuals de les partícules HDL, és a dir, la mesura de les concentracions de colesterol associat a les partícules HDL, no és la millor manera d'avaluar la qualitat i dinàmica morfològica natural d'aquestes lipoproteïnes, ja que com s'ha vist prèviament, existeix una gran dispersió i heterogeneïtat d'aquestes partícules que desenvolupen un paper pro- o antiaterogènic independentment del contingut en colesterol.

En l'**Estudi 1** d'aquesta Tesi Doctoral i com a resposta al primer objectiu plantejat, presentem per primera vegada dades que evidencien que la presència partícules HDL de major tamany (de 12 a 16 nm) associada a la infecció pel VIH, poden variar substancialment durant el tractament antiretroviral i que es correlacionen significativament amb les concentracions plasmàtiques de marcadors inflamatoris. A més a més, mostrem com els pacients no tractats i amb un baix nombre de limfòcits T CD4+ presenten una quantitat menor de partícules HDL petites (de menys de 11 nm), fet que s'associa significativament amb menys activitat PON1 i unes concentracions circulants de MCP-1 més elevades. Per tant, creiem que aquells pacients no controlats virològicament i amb un alt grau d'immunosupressió presenten una distribució de les partícules HDL amb un perfil més aterògenic i amb menys capacitat antiinflamatòria i antioxidant. Tot i que no queda clar si aquestes variacions tenen alguna relació directa o indirecta amb el procés d'aterosclerosi accelerada que presenten aquests pacients, els nostres resultats confirmen resultats previs del nostre grup, en els quals mostràvem com les concentracions augmentades de MCP-1 i disminuïdes d'activitat PON1 s'associaven amb la presència d'aterosclerosi [47,156]. Som conscients, però, que el baix nombre de pacients inclosos en aquest primer estudi limita l'acceptació dels nostres resultats, els quals s'haurien de confirmar en estudis amb un nombre superior de participants. A més a més, el disseny transversal que hem utilitzat determina la impossibilitat d'indicar la causalitat de la infecció pel VIH en les modificacions de les partícules HDL en comparació a un grup d'individus no infectats.

Cal destacar que els estudis més recents dels nostre grup i que són una continuació dels estudis presentats en aquesta Tesi Doctoral (**veure Material Suplementari**), mostren que en la població de pacients infectats pel VIH, tots els individus estudiats presenten una marcat augment (fins a 10 vegades) de la concentració sèrica de PON3 i SAA, i hem descrit una relació inversa entre els valors circulants de PON3 i la concentració de LDL-oxidada, i una relació directa entre els valors de SAA i la concentració de diferents marcadors inflamatoris, fet que recolzaria el concepte que PON3 juguen un paper protector envers l'estrès oxidatiu i l'augment de la peroxidació lipídica durant la infecció, i que el SAA podria interpretar-se com un reflex de l'estat pro-inflamatori associat a la infecció. No existeixen gaires dades en la literatura de condicions clíniques associades a augments en l'expressió de PON3 que avalin els nostres resultats, però en un estudi recent s'ha descrit una augment similar (de fins a 5 vegades) en els valors de RNA missatger de PON3 en estadis avançats de gestació, un estat fisiològic en el qual s'ha observat un augment de l'estrès oxidatiu [157]. A més a més, aquest resultats també suggereixen, tal i com s'esperava, que la infecció pel VIH s'associa amb un important augment de reactants de fase aguda que presenten activitat antivírica *in vitro* [158] i que podrien modificar de manera significativa la composició proteica de les partícules HDL. En aquest sentit, les partícules HDL semblen jugar un paper central en el resposta immunitària innata [159,160], i els resultat dels nostres estudi on es descriuen associacions entre les concentracions de PON3 i SAA, amb els valors de  $\beta$ -2-microglobulina i el nombre de limfòcits T CD4+ suggereix que la PON3 i el SAA, i per tant les partícules HDL, podrien presentar certa funcionalitat antivírica.

L'associació inversa entre la concentració de colesterol-HDL i el risc de malaltia coronària ha estat ben establert en diferents estudis epidemiològics [152]. Conseqüentment, el colesterol-HDL i altres determinacions lipídiques han estat incloses en les guies actuals de pràctica clínica [153]. En aquest sentit, l'aparició dels anomenats assaigs homogenis en els diferents laboratoris clínics dels nostres hospitals, ha estat molt ben acceptada. Tanmateix, aquests mètodes són poc acurats en pacients amb alteracions metabòliques com malaltia cardiovascular, renal o hepàtica [154]. Els resultats que presentem en l'**Estudi 2** i en resposta a l'Objectiu 2 plantejat en aquesta Tesi Doctoral mostren com el greu trastorn inflamatori associat a la infecció pel VIH també determina una valoració equívoca de les concentracions de colesterol-HDL. Hem trobat discrepàncies en tres de cada deu determinacions realitzades, i aquestes s'associen significativament a la hipergammaglobulinèmia, tal i com ja s'havia descrit prèviament [155]. D'altra banda, altres estudis previs

suggereixen que la co-infecció pel virus de l'hepatitis C, també podria representar un factor de confusió important en pacients amb hepatopatia vírica i replicació viral no controlada. Malauradament i degut a aspectes tècnics i econòmics, la determinació de la concentració de colesterol-HDL en aquests pacients no pot ser realitzada utilitzant els mètodes de referència estàndards no rutinaris en els nostres laboratoris clínics automatitzats. Per tant, hem de ser conscients de les limitacions dels mètodes utilitzats en la rutina diària i hem de prendre molta precaució alhora d'interpretar els valors de colesterol-HDL en aquests pacients. A més a més, en la pràctica clínica i en els estudis epidemiològics és molt habitual emmagatzemar una o varies alíquotes de sèrum dels participants en projectes d'investigació per tal d'avaluar posteriorment i de forma conjunta diferents variables bioquímiques. Aquest costum, tot i ser utilitzat extensament, no és vàlid quan l'estabilitat durant l'emmagatzematge del component a analitzar no ha estat prèviament determinada. En l'estudi 2 d'aquesta Tesi Doctoral també mostrem l'efecte deleteri del procés d'emmagatzematge, tant en mostres de pacients infectats pel VIH com en mostres d'individus no infectats, alhora de determinar la concentració de colesterol-HDL utilitzant l'assaig homogeni. Tanmateix, la disminució observada en els valors de colesterol-HDL és significativament més gran en les mostres dels pacients infectats pel VIH, i aquesta disminució s'associa molt marcadament de nou amb la concentració plasmàtica inicial de gammaglobulines. Tot i que l'anàlisi de regressió lineal ha determinat una fórmula que prediu el 80 % dels valors de colesterol-HDL en aquests pacients, són necessaris nous estudis en poblacions més extenses per tal de confirmar aquests resultats. Així, queda clar, que la determinació de les concentracions de colesterol-HDL, no és la metodologia més adequada per tal de valorar la qualitat d'aquestes lipoproteïnes.

La infecció pel VIH s'associa a un estímul inflamatori persistent amb elevades concentracions circulants de MCP-1, reconegut marcador d'inflamació i de risc cardiovascular [151]. Tot i així, tal i com demostrem en l'**Estudi 3** i en resposta a l'últim objectiu plantejat en aquesta Tesi Doctoral, a més a més de la càrrega genètica dels individus infectats pel VIH, existeixen altres factors que regulen i modulen la resposta metabòlica determinada per l'estat inflamatori lligat als valors de MCP-1, ja que no tots els pacients amb una resposta inflamatòria exacerbada presenten, en conseqüència, alteracions metabòliques pro-aterogèniques (**Figura 7**). En concret, els individus portadors de l'haplotip 2 (en referència als diferents polimorfismes estudiats en el gen *CCL2*), determinat per la variant gènica +3726C que, curiosament, es troba relacionada amb les concentracions de colesterol-HDL, presenten un fenotip metabòlic antiaterogènic, en comparació amb els individus portadors dels haplotips 1 i 5,



En resum, els resultats presentats en aquesta Tesi Doctoral suggereixen que les propietats anti-aterogèniques de les partícules HDL en condicions normals, podrien trobar-se alterades en els individus infectats pel VIH tot i estar sotmesos a un tractament antiretroviral d'alta activitat considerat immuno-virològicament exitós, ja que presenten greus alteracions del seu tamany, distribució i composició proteica. A més a més, les determinacions estàndards dels laboratoris clínics per a determinar el perfil lipídic no són les més adequades per avaluar la qualitat de les partícules HDL, i en conseqüència, el risc de malaltia cardiovascular present en aquest pacients.

## **6. Conclusions Finals**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

**1. La infecció pel VIH s'associa amb un tamany i distribució de partícules HDL amb un perfil més aterogènic i amb menys capacitat anti-inflamatòria i anti-oxidant.**

- 1.1. El control de la infecció pot ser determinant pel manteniment de les seves funcions.
- 1.2. Aquests canvis no poden ser detectats pels mètodes actuals instal·lats en els laboratoris dels nostres hospitals. Són necessaris estudis prospectius de llarga durada per tal d'investigar més profundament la possible influència de les modificacions de la partícula en el curs de la infecció i en el desenvolupament de l'aterosclerosi

**2. La infecció pel VIH determina una valoració equívoca de les concentracions de colesterol-HDL.**

- 2.1. Els laboratoris d'investigació en lípids que realitzen assaigs clínics de llarga durada han de tenir en compte les limitacions del mètode homogeni en la determinació de colesterol-HDL i interpretar amb cautela els resultats obtinguts.
- 2.2. La monitorització de les partícules HDL en aquests pacients no ha d'estar basat únicament en la determinació de la concentració del contingut de colesterol, sinó que ha d'incloure la determinació d'altres paràmetres associats a les partícules HDL.

**3. Les variants gèniques de CCL2 contribueixen parcialment a les alteracions metabòliques i a la presència d'aterosclerosi subclínica en pacients infectats pel VIH.**

- 3.1. Els nostres resultats podrien tenir implicacions clíniques importants degut a què els fàrmacs utilitzats actualment per a reduir la mortalitat cardiovascular i l'equilibri de les alteracions metabòliques són molt efectius i podrien ser particularment indicats en els pacients infectats pel VIH amb evidències de malaltia arterial.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

## **7. Referències**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

1. Nabel EG. Cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2003;349:60-72.
2. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-41.
3. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
4. Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Graciani A, Villar F, Herruzo R. Mortality attributable to cardiovascular risk factors in Spain. *Eur J Clin Nutr* 2003;57 Suppl 1:S18-21.
5. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
6. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837-47.
7. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and for the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2007;28:1462-536.
8. Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 1990;343:531-5.
9. De Caterina R, Libby P. Endothelial dysfunctions and vascular diseases 2007
10. Friis-Moller N, Reiss P, Sabin CA, et al. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2007;356:1723-35.
11. Calmy A, Gayet-Ageron A, Montecucco F, et al; STACCATO Study Group. AIDS HIV increases markers of cardiovascular risk: results from a randomized, treatment interruption trial. *AIDS*. 2009;23:929-39.
12. Ross AC, Armentrout R, O'Riordan MA, et al. Endothelial activation markers are linked to HIV status and are independent of antiretroviral therapy and lipotrophy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;49:499-506.
13. El-Sadr WM, Lundgren JD, Neaton JD, et al. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med*. 2006;355:2283-96.
14. Martínez E, Larrouse M, Gatell JM. Cardiovascular disease and HIV infection: host, virus or drugs? *Curr Opin Infect Dis*. 2009;22:28-34.
15. Kuller LH, Tracy R, Belloso W, et al; INSIGHT SMART Study Group. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med*. 2008;5:e203.
16. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-74.
17. Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation*. 1997;96:4095-103.
18. Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet*. 1997;350:430-6.
19. Fisher SD, Miller TL, Lipshultz SE. Impact of HIV and highly active antiretroviral therapy on leukocyte adhesion molecules, arterial inflammation, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2006;185:1-11.
20. De Larrañaga GF, Petroni A, Deluchi G, Alonso BS, Benetucci JA. Viral load and disease progression as responsible for endothelial activation and/or injury in human immunodeficiency virus-1- infected patients. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003;14:15-8.
21. Wolf K, Tsakiris DA, Weber R, Erb P, Battegay M. Antiretroviral therapy reduces markers of endothelial and coagulation activation in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*. 2002;185:456-62.
22. Buonaguro L, Barillari G, Chang HK, et al. Effects of the human immunodeficiency virus type 1 tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *J Virol*. 1992;66:7159-67.
23. Scala G, Ruocco MR, Ambrosino C, et al. The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus1 TAT protein. *J Exp Med*. 1994;179:961-71.
24. Swingler S, Mann A, Jacque J, et al. HIV Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat Med*. 1999;5:997-1003.
25. Olivetta E, Percario Z, Fiorucci G, et al. HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation. *J Immunol*. 2003;170:1716-27.

26. Takano Y, Shimokado K, Hata Y, Yoshida M. HIV envelope protein gp120-triggered CD4<sup>+</sup>T-cell adhesion to vascular endothelium is regulated via CD4 and CXCR4 receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772:549-55.
27. Olmo M, Alonso-Villaverde C, Peñaranda M, et al, and STOPPAR Study Team. Effect of HAART Interruption on Plasma Inflammatory Markers Associated with Cardiovascular Disease. 24-Month Results from a Randomized Study. 16th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections. Montreal; 2009. Abstract 738.
28. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-9.
29. Mu H, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C. Current update on HIV-associated vascular disease and endothelial dysfunction. *World J Surg*. 2007;31:632-43.
30. Eugenin EA, Morgello S, Klotman ME, et al. Human immunodeficiency virus (HIV) infects human arterial smooth muscle cells in vivo and in vitro: implications for the pathogenesis of HIV-mediated vascular disease. *Am J Pathol*. 2008;172:1100-11.
31. Oshima T, Flores SC, Vaitaitis G, et al. HIV-1 Tat protein increases endothelial solute permeability through tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *AIDS*. 2000;14:475-82.
32. Jia H, Lohr M, Jezequel S, Davis D, et al. Cysteine-rich and basic domain HIV-1 Tat peptides inhibit angiogenesis and induce endothelial cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284:469-79.
33. Huang MB, Khan M, García-Barrio M, Powell M, Bond VC. Apoptotic effects in primary human umbilical vein endothelial cell culture caused by exposure to virion-associated and cell-membrane-associated HIV-1 gp120. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001;27:213-21.
34. Fiala M, Murphy T, MacDougall J, et al. HAART drugs induce mitochondrial damage and intercellular gaps and gp120 causes apoptosis. *Cardiovasc Toxicol*. 2004;4:327-37.
35. Westendorp MO, Shatrov VA, Schulze-Osthoff K, et al. HIV-1 Tat potentiates TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *Embo J*. 1995;14:546-54.
36. Dhawan S, Puri RK, Kumar A, Duplan H, Masson JM, Aggarwal BB. Human immunodeficiency virus-1 tat protein induces the cell surface expression of endothelial leucocyte adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 in human endothelial cells. *Blood*. 1997;90:1535-44.
37. Ren Z, Yao Q, Chen C. HIV-1 envelope glycoprotein 120 increases intercellular adhesion molecule-1 expression by human endothelial cells. *Lab Invest*. 2002;82:245-55.
38. Gupta SK, Johnson RM, Saha C, et al. Improvement in HIV-related endothelial dysfunction using the anti-inflammatory agent salsalate: a pilot study. *AIDS*. 2008;12:653-5.
39. Francisci D, Giannini S, Baldelli F, et al. HIV type 1 infection, and not short-term HAART, induces endothelial dysfunction. *AIDS*. 2009.
40. Kristoffersen US, Kofoed K, Kronborg G, Giger AK, Kjaer A, Lebech AM. Reduction in circulating markers of endothelial dysfunction in HIV-infected patients during antiretroviral therapy. *HIV Med*. 2009;10:79-87.
41. Van Vonderen MG, Hassink EA, Van Agtmael MA, et al. Increase in carotid artery intima-media thickness and arterial stiffness but improvement in several markers of endothelial function after initiation of antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2009;199:1186-94.
42. Torriani FJ, Komarow L, Parker RA, et al; ACTG 5152s Study Team. Endothelial function in human immunodeficiency virus-infected antiretroviral-naïve subjects before and after starting potent antiretroviral therapy: The ACTG (AIDS Clinical Trials Group) Study 5152s. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:569-76.
43. Pappasavvas E, Azzoni L, Pistilli M, et al. Increased soluble vascular adhesion molecule-1 plasma levels and soluble intercellular adhesion molecule-1 during antiretroviral therapy interruption and retention of elevated soluble vascular cellular adhesion molecule-1 levels following resumption of antiretroviral therapy. *AIDS*. 2008;22:1153-61.
44. Aukrust P, Luna L, Ueland T, et al. Impaired base excision repair and accumulation of oxidative base lesions in CD4<sup>+</sup> T cells of HIV-infected patients. *Blood*. 2005;105:4730-5.
45. Hulgan T, Morrow J, D'Aquila RT, et al. Oxidant stress is increased during treatment of human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis*. 2003;37:1711-7.

46. Masiá M, Padilla S, Bernal E, et al. Influence of antiretroviral therapy on oxidative stress and cardiovascular risk: a prospective cross-sectional study in HIV-infected patients. *Clin Ther*. 2007;29:1448-55.
47. Parra S, Alonso-Villaverde C, Coll B, et al. Serum paraoxonase-1 activity and concentration are influenced by human immunodeficiency virus infection. *Atherosclerosis*. 2007;194:175-81.
48. Kline ER, Kleinhenz DJ, Liang B, et al. Vascular oxidative stress and nitric oxide depletion in HIV-1 transgenic rats are reversed by glutathione restoration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H2792-804.
49. Westendorp MO, Shatrov VA, Schulze-Osthoff K, et al. HIV-1 tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *EMBO J*. 1995;14:546-54.
50. Kahn JO, Walker BD. Current concepts: acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. 1998;339:33-9.
51. Mocroft A, Boffi M, Lipman M, et al. CD8<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup> lymphocyte percentage: a useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1997;14:158-62.
52. Jacobson JM. The rationale for immunosuppressive therapy for HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2007;2:207-12.
53. Tebas P, Henry WK, Matining R, et al. Metabolic and immune activation effects of treatment interruption in chronic HIV-1 infection: implications for cardiovascular risk. *PLoS ONE*. 2008;3:e2021.
54. Rose H, Woolley J, Hoy J, et al. HIV infection and high-density lipoprotein: the effect of the disease vs. the effect of treatment. *Metabolism*. 2006;55:90-5.
55. Bernal E, Masiá M, Padilla S, Gutiérrez F. High-density lipoprotein cholesterol in HIV-infected patients: evidence for an association with HIV-1 viral load, antiretroviral therapy status, and regimen composition. *AIDS Patient Care and STDs*. 2008;22:569-75.
56. Mujawar Z, Rose H, Morrow MP, et al. Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. *PLoS Biol*. 2006;4:e365.
57. Rose H, Hoy J, Woolley J, et al. HIV infection and high density lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis*. 2008;199:79-86.
58. Phillips AN, Carr A, Neuhaus J, et al. Interruption of antiretroviral therapy and risk of cardiovascular disease in persons with HIV-1 infection: exploratory analyses from the SMART trial. *Antivir Ther*. 2008;13:177-87.
59. Boden WE. High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Am J Cardiol*. 2000;86:19L-22L.
60. Duprez D, and INSIGHT/SMART Group. High-density lipoprotein particles but not low-density lipoprotein particles predict cardiovascular disease events in HIV patients: strategies for management of ART Study. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2009). Montreal. February 8-11, 2009. Abstract 149.
61. Seoane E, Resino S, Micheloud D, et al. Lipid and apoprotein profile in HIV-1-infected patients after CD4-guided treatment interruption. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;48:455-9.
62. Grunfeld C, Kotler DP, Hamadeh R, Tierney A, Wang J, Pierson RN. Hypertriglyceridemia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med*. 1989;86:27-31.
63. Adam E, Melnick JL, Probstfeld JL, et al. High level of cytomegalovirus antibody in patients requiring vascular surgery for atherosclerosis. *Lancet*. 1987;2:291-3.
64. Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, et al. Increased prevalence of carotid atherosclerosis in hepatitis B virus carriers. *Circulation*. 2002;105:1028-30.
65. Muhlestein JB. Chronic infection and coronary artery disease. *Cardiol Rev*. 2000;84:123-9.
66. Ghotaslou R, Aslanabadi N, Ghojzadeh M. Hepatitis B virus infection and the risk of coronary atherosclerosis. *Ann Acad Med Singapore*. 2008;37:913-5.
67. Völzke H, Schwahn C, Wolff B, et al. Hepatitis B and C virus infection and the risk of atherosclerosis in a general population. *Atherosclerosis*. 2004;174:99-103.



68. Momiyama Y, Ohmori R, Kato R, Taniguchi H, Nakamura H, Ohsuzu F. Lack of any association between persistent hepatitis B or C virus infection and coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2005;181:211-3.
69. Tong DY, Wang XH, Xu CF, Yang YZ, Xiong SD. Hepatitis B virus infection and coronary atherosclerosis: results from a population with relatively high prevalence of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol*. 2005;11:1292.
70. Sung J, Song YM, Choi YH, Ebrahim S, Davey Smith G. Hepatitis B virus seropositivity and the risk of stroke and myocardial infarction. *Stroke*. 2007;38:1436-41.
71. Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, et al. Association between hepatitis C virus seropositivity, carotid-artery plaque, and intima media thickening. *Lancet*. 2002;359:133-5.
72. Alyan O, Kacmaz F, Ozdemir O, et al. Hepatitis C infection is associated with increased coronary artery atherosclerosis defined by modified Reardon severity score system. *Circ J*. 2008;72:1960-5.
73. Vassalle C, Masini S, Bianchi F, Zucchelli GC. Evidence for association between hepatitis C virus seropositivity and coronary artery disease. *Heart*. 2004;90:565-6.
74. Bedimo R, Westfall A, Mugavero M, Drechsler H, Khanna N, Saag M. HCV co-infection and risk of acute myocardial and cerebrovascular disease among HIV-infected patients in the pre-HAART and HAART eras. XVII International AIDS Conference. Mexico City, 3-8 August 2008. [THAB0205].
75. Weber R, Sabin C, Reiss P, et al, and The D:A:D Study Group. Hepatitis Virus Co-infections and Risk of Diabetes Mellitus and Myocardial Infarction in HIV-infected Persons: The D:A:D Study. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, 3-6 February 2008. Abstract 1082.
76. Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, et al. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2008;134:416-23.
77. Fartoux L, Poujol-Robert A, Guéchet J, Wendum D, Poupon R, Serfaty L. Insulin resistance is a cause of steatosis and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut*. 2005;54:1003-8.
78. De Larrañaga GF, Wingeyer SD, Puga LM, Alonso BS, Benetucci JA. Relationship between hepatitis C virus (HCV) and insulin resistance, endothelial perturbation, and platelet activation in HIV-HCV-coinfected patients under highly active antiretroviral treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25:98-103.
79. Serfaty L, Capeau J. Hepatitis C, insulin resistance and diabetes: clinical and pathogenic data. *Liver Int*. 2009;29 Suppl 2:13-25.
80. Hanouneh IA, Feldstein AE, López R, et al. Clinical significance of metabolic syndrome in the setting of chronic hepatitis C virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6:584-9.
81. Bani-Sadr F, Carrat F, Bedossa P, et al; ANRS HC02- Ribavirin Study team. Hepatic steatosis in HIV-HCV coinfected patients: analysis of risk factors. *AIDS*. 2006;20:525-31.
82. Kawaguchi Y, Mizuta T, Oza N, et al. Eradication of hepatitis C virus by interferon improves whole-body insulin resistance and hyperinsulinaemia in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2009;29:871-7.
83. Rodríguez-Torres M, Govindarajan S, Solá R, et al. Hepatic steatosis in HIV/HCV co-infected patients: correlates, efficacy and outcomes of anti-HCV therapy: a paired liver biopsy study. *J Hepatol*. 2008;48:756-64.
84. Oliviero U, Bonadies G, Apuzzi V, et al. Human immunodeficiency virus per se exerts atherogenic effects. *Atherosclerosis*. 2009;204:586-9.
85. Schillaci G, De Socio GV, Pucci G, et al. Aortic stiffness in untreated adult patients with human immunodeficiency virus infection. *Hypertension*. 2008;52:308-13.
86. Baker J, Duprez D, Rapkin J, Grimm R, Neaton J, Henry K. Untreated HIV infection is associated with impaired arterial elasticity. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Montreal, 8-11 February 2009. Abstract 725.
87. Hsue P, Deeks S, Schnell A, et al. HIV infection is independently associated with detectable coronary artery calcium. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Montreal, 8-11 February 2009. Abstract 724.

88. Mestek M, Stauffer B, Westby C, et al. Endothelial fibrinolytic capacity is impaired in HIV-1-infected men 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Montreal, 8-11 February 2009. Abstract 728.
89. Fruchart JC, Ailhaud G, Bard JM. Heterogeneity of high density lipoprotein particles. *Circulation*. 1993;87:1122-7.
90. Skinner ER. High-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol*. 1994;5:241-7.
91. Martinez LO. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 2003; 421:75-9.
92. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res*. 1999;40:781-96.
93. Czarnecka H, Yokoyama S. Regulation of cellular cholesterol efflux by lecithin:cholesterol acyltransferase reaction through nonspecific lipid exchange. *J Biol Chem*. 1996;271:2023-8.
94. Lawn RM. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* 1999; 104:R25-31.
95. Takahashi Y, Smith JD. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:11358-63.
96. Camarota LM, Chapman JM, Hui DY, Howles PN. Carboxyl ester lipase cofractionates with scavenger receptor BI in hepatocyte lipid rafts and enhances selective uptake and hydrolysis of cholesteryl esters from HDL3. *J Biol Chem*. 2004;279:27599-606.
97. Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*. 1995;115:243-53.
98. Banka CL. High density lipoprotein and lipoprotein oxidation. *Curr Opin Lipidol*. 1996;7:139-42.
99. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*. 2004;95:764-72.
100. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res*. 2000;41:1481-94.
101. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res*. 2000;41:1495-508.
102. Van Lenten BJ, Navab M, Shih D, Fogelman AM, Lusis AJ. The role of highdensity lipoproteins in oxidation and inflammation. *Trends Cardiovasc Med*. 2001;11:155-61.
103. Garner B, Waldeck AR, Witting PK, Rye KA, Stocker R. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem*. 1998;273:6088-95.
104. Watson AD. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96:2882-91.
105. Watson AD. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 95:774-82.
106. Vohl MC. A novel lecithin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation. *Biochemistry* 1999; 38:5976-81.
107. Chen N. Physiologic concentrations of homocysteine inhibit the human plasma GSH peroxidase that reduces organic hydroperoxides. *J Lab Clin Med* 2000; 136:58-65.
108. Lupattelli G. *Am J Cardiol* 2002; 90:648.
109. Suc I, Escargueil-Blanc M, Trolly R, Salvayre A, Negre-Salvayre. HDL and apoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2158-2166 .
110. Sugano M, K Tsuchida, N Makino. High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-[alpha]-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;272:872-876 .
111. Navab M, Hama SY, Hough GP, et al. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J Lipid Res* 2001; 42:1308-1317. Library Holdings

112. Nicholls SJ, Lundman P, Harmer JA, et al. Consumption of saturated fat impairs the anti-inflammatory properties of high-density lipoproteins and endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:715-720.
113. Tall AR, Yvan-Charvet L, Wang N. The failure of torcetrapib: was it the molecule or the mechanism? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:257-260.
114. Ansell BJ, Navab M, Hama S, et al. Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation* 2003; 108:2751-2756.
115. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, et al. The double jeopardy of HDL. *Ann Med* 2005; 37:1-6.
116. Barter P. The inflammation: lipoprotein cycle. *Atheroscler Suppl* 2005;6:15-20.
117. Baker PW, Rye KA, Gamble JR, et al. Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J Lipid Res* 2000; 41:1261-1267.
118. Watson KE, Hama S, Fonarow GC, et al. Metabolic syndrome patients have higher plasma lipid hydroperoxides and more pro-inflammatory HDL than dyslipidemic control subjects, even with comparable levels of HDL, hs-CRP and paraoxonase activity. *Circulation* 2004; 110:III-52.
119. Kaysen GA. Disorders in high-density metabolism with insulin resistance and chronic kidney disease. *J Ren Nutr* 2007; 17:4-8.
120. Tan KCB, Chow W-S, Lam JCM, et al. HDL dysfunction in obstructive sleep apnea. *Atherosclerosis* 2006; 184:377-382.
121. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, et al. 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;96:2758-2767.
122. McMahon M, Grossman J, Fitzgerald J, et al. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54:2541-2549.
123. Zaratin AC, Quintao EC, Sposito AC, et al. Smoking prevents the intravascular remodeling of high-density lipoprotein particles: implications for reverse cholesterol transport. *Metabolism* 2004;53:858.
124. Gowri MS, Van der Westhuyzen DR, Bridges SR, Anderson JW. Decreased protection by HDL from poorly controlled type 2 diabetic subjects against LDL oxidation may be due to the abnormal composition of HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2226-2233.
125. Hansel B, Giral P, Nobecourt E, et al. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4963-4971.
126. Zago V, Sanguinetti S, Brites F, et al. Impaired high density lipoprotein antioxidant activity in healthy postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2004;177:203-210
127. Van Lenten BJ, Wagner AC, Nayak DP, et al. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection. *Circulation* 2001;103:2283-2288.
128. Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ, et al. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N Engl J Med* 2004; 351:2611-2618.
129. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1997; 145:408-415.
130. Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, et al. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2005; 52:722-732.
131. Sviridov D, Chin-Dusting J, Nestel P, et al. Elevated HDL cholesterol is functionally ineffective in cardiac transplant recipients: evidence for impaired reverse cholesterol transport. *Transplantation* 2006; 81:361-366.
132. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, et al. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 2000; 43:312-320.
133. Ferretti G, Bacchetti T, Marchionni C, et al. Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetol* 2001; 38:163-169.

134. Ferretti G, Bacchetti T, Negre-Salvayre A, et al. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis* 2006; 184:1-7.
135. Rohrer L, Hersberger M, von Eckardstein A. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15:269-278.
136. Nicholls SJ, Zheng L, Hazen SL. Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15:212-219.
137. Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, et al. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2004;114:529-541.
138. Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan ML, et al. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA* 2003;289:1675-1680.
139. Zhou T, Zhou SH, Qi SS, et al. The effect of atorvastatin on serum myeloperoxidase and CRP levels in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 2006.
140. Schwarz B. Oxidative stress during viral infection: A review. *Free Rad BiolMed*. 1996, 21:641-649.
141. Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Redox imbalance and its control in HIV infection. *Antioxid Redox Signal*. 2002;4:455-464.
142. Sandstrom PA, Murray J, Folks T M, Diamond A. Antioxidant defenses influence HIV-1 replication and associated cytopathic effects. *Free Radical Biol Med*. 1998;24:1485-1491.
143. Elbim C, Pillet S, Prevost MH, Preira A, Girard PM, Rogine N, et al. Redox and activation status of monocytes from human Immunodeficiency virus-infected patients: Relationship with viral-load. *J Virol*. 1999;73:4561-4566.
144. Buttkie TM, Sandstrom PA. Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes. *Free Radic Res*. 1995;22:389-97. Review.
145. Boyd M, Reiss P. The long-term consequences of antiretroviral therapy: a review. *J HIV Ther*. 2006;11:26-35.
146. Grinspoon SK. Metabolic syndrome and cardiovascular disease in patients with human immunodeficiency virus. *Am J Med*. 2005;118:23S-28S.
147. Carr A, Samaras K, Burton S, Freund J, Chisholm DJ, Cooper DA: A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance due to HIV protease inhibitors. *AIDS*. 1998;12:F51-F58.
148. Navab M, Shecter I, Anantharamaiah GM, et al. Structure and function of HDL mimetics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:164-168.
149. Vaziri ND, Moradi H, Pahl MV, et al. In vitro stimulation of HDL anti-inflammatory activity and inhibition of LDL pro-inflammatory activity in the plasma of patients with end-stage renal disease by an ApoA-1 mimetic patient. *Kidney Int* 2009;76:437-444.
150. Pereira, S.A., Batuca, J.R., Caixas, U., et al. Effect of efavirenz on high-density lipoprotein antioxidant properties in HIV-infected patients. *Br J Clin Pharmacol* 2009;68:891-897.
151. Parra S, Coll B, Aragonès G, et al. Nonconcordance between subclinical atherosclerosis and the calculated Framingham risk score in HIV-infected patients: relationships with serum markers of
152. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977;62:707-714.
153. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the NCEP final report. *Circulation* 2002;106:3143-3421.
154. Simo JM, Castellano I, Ferre N et al. Evaluation of a homogeneous assay for high-density lipoprotein cholesterol: limitations in patients with cardiovascular, renal, and hepatic disorders. *Clin Chem* 1998;44:1233-1241.
155. Zapico-Muniz E, Jorba-Castany O, Bonet-Marques R et al. A cause of falsely low HDL concentrations in HIV-infected patients: increased polyclonal serum immunoglobulin. *ClinBiochem* 2005;38:46-49.
156. Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, et al. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation* 2004;110:2204-9.

157. Belteki G, Kempster SL, Forhead AJ, et al. Paraoxonase-3, a putative circulating antioxidant, is systematically up-regulated in late gestation in the fetal rat, sheep, and human. *J Clin Endocr Metab* 2010;95:3798-3805.
158. Kramer HB, Lavender KJ, Qin L, et al. Elevation of intact and proteolytic fragments of acute phase proteins constitutes the earliest systemic antiviral response in HIV-1 infection. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000893.
159. Han R. Plasma lipoproteins are important components of the immune system. *Microbiol Immunol* 2010;54:246-253.
160. Yu BL, Wang SH, Peng DQ, Zhao SP. HDL and immunomodulation: an emerging role of HDL against atherosclerosis. *Immunol Cell Biol* 2010;88:285-290.

## **8. Annex**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

## 8.1. ANNEX I: TERÀPIA ANTIRETROVIRAL EN LA INFECCIÓ PEL VIH

### 8.1.1. Història de la teràpia antiretroviral

La identificació del VIH com l'agent infeccios causant de la SIDA constitueix un dels esdeveniments científics més importants de la història de la medicina. Igualment, el desenvolupament d'una teràpia antiretroviral (ARV) eficaç contra la infecció pel VIH ha estat, sense dubte, un dels avenços més importants que han tingut lloc al llarg dels 24 anys transcorreguts des de l'inici de l'epidèmia de la SIDA.

Durant aquest temps els esforços de la comunitat científica per controlar la infecció no ha fet més que créixer, i el coneixement de la patogènia del virus ha contribuït al desenvolupament de teràpies que actuen en punts clau del cicle vital del VIH. Bàsicament, la teràpia ARV pretén disminuir al màxim la virèmia en l'organisme del pacient infectat, i contribuir al restabliment normal del sistema immunitari. D'aquesta manera, s'aconsegueix millorar l'evolució natural de la infecció i disminuir dràsticament la mortalitat dels pacients. El primer fàrmac ARV administrat contra el VIH fou la zidovudina (AZT), que va ser aprovat per la *FDA (Food and Drug Administration)* l'any 1987. Originàriament, l'AZT es va desenvolupar com un fàrmac contra el càncer, però no va resultar efectiu en aquest sentit. No obstant, el 1985 es va demostrar la seva activitat anti-VIH *in vitro*, i des d'aleshores s'ha utilitzat amb aquesta finalitat. L'AZT és un anàleg del nucleòsid timidina capaç d'interferir en la replicació del virus mitjançant la inhibició de la transcriptasa inversa (TI) del VIH. S'inclou dins la família de fàrmacs coneguts com inhibidors de la TI anàlegs de nucleòsid (ITIAN). Durant anys va constituir l'únic ARV capaç de frenar la progressió de la infecció vírica, que va millorar la supervivència dels pacients amb SIDA. Però la seva administració en forma de monoteràpia resultava insuficient i, a més, la seva utilització continuada produïa miopatia als pacients com a principal efecte secundari. Entre 1991 i 1994 es van introduir altres fàrmacs anàlegs de nucleòsid alternatius contra el VIH, com la didanosina (ddI), la zalcitabina (ddC) i l'estavudina (d4T), que presentaven un mecanisme d'acció ARV similar a l'AZT. A mida que proliferaven els fàrmacs ARVs, augmentava la probabilitat d'èxit terapèutic, però també la incertesa sobre quin era el fàrmac més adequat i la dosi més eficaç. Situant-nos en context, aquesta època va resultar una de les més mortíferes per la SIDA, doncs molts individus s'havien contagiats a l'inici de la dècada dels 80. La preocupació sanitària, científica i social anava en augment, i els esforços es concentraven en el desenvolupament d'una



teràpia eficaç contra el VIH i contra les infeccions oportunistes. El 1995 es va demostrar que l'eficàcia de la teràpia amb dos anàlegs de nucleòsid era significativament superior a la monoteràpia. A partir d'aquest moment es va implantar l'administració d'una teràpia combinada amb dos anàlegs de nucleòsid. Paral·lelament, gràcies als progressos en el coneixement de l'estructura molecular del VIH, es van desenvolupar els fàrmacs inhibidors de la proteasa (IP) (saquinavir -SQV-, ritonavir -RTV- i indinavir -IDV-), un nou grup d'ARVs amb capacitat d'interferir amb la proteasa del VIH. El 1996 es va demostrar que l'addició d'un IP (RTV) al tractament amb dos anàlegs de nucleòsids millorava radicalment l'eficàcia ARV i la supervivència dels pacients infectats. Aquesta investigació revolucionà el camp de la teràpia ARV, i va iniciar una era farmacològica basada en l'ús del tractament combinat amb tres ARVs, conegut com a teràpia ARV de gran activitat (TARGA). Donat el benefici clínic del TARGA, el seu ús es va anar generalitzant a gran velocitat, fins el punt que actualment constitueix el patró terapèutic habitual als països desenvolupats des del moment en el què està indicat l'inici del tractament. A partir d'aleshores, van continuar emergint ARVs amb més potència terapèutica. El 1996 es van incorporar els ARVs inhibidors de la TI no-anàlegs de nucleòsid (ITINAN) (nevirapina -NVP-), i més recentment, els inhibidors de la fusió (IF) (enfuvirtide -T20-), que interfereixen amb l'entrada del virus a la cèl·lula.

La intensa investigació farmacològica portada a terme durant aquests anys ha aportat grans beneficis als pacients que conviuen amb el VIH. En primer lloc, ha donat com a fruit un ampli espectre terapèutic, doncs actualment s'utilitzen en humans més de 20 ARVs diferents, que combinats entre si augmenta la possibilitat de tractament de forma considerable. Com a resultat, el TARGA ha aconseguit disminuir la càrrega viral de molts dels malalts infectats pel VIH fins a unes concentracions indetectables i augmentar el nivell de limfòcits T CD4+, la qual cosa ha reduït dràsticament la mortalitat i morbiditat dels pacients. A més, la impressió que tenen els pacients d'absoluta dependència del tractament farmacològic ha disminuït, doncs el nombre de comprimits diaris i la dosi administrada s'ha reduït considerablement. En conseqüència s'ha millorat l'adherència a la teràpia ARV, la qual cosa suposa un punt clau per l'èxit terapèutic, que depèn molt estretament de la correcta administració dels fàrmacs. En aquestes condicions, la infecció pel VIH ha passat de ser una malaltia d'elevada mortalitat a considerar-se una malaltia crònica. D'altra banda, l'ús crònic dels ARVs, juntament amb una major supervivència dels pacients ha anat associat amb un augment de la descripció clínica d'efectes farmacològics adversos, que actualment representen un dels principals problemes vinculats a l'administració d'ARVs. També,

cal tenir en compte que una adherència baixa al tractament pot promoure la generació de soques víriques resistents als fàrmacs i conduir al fracàs virològic. Aquest fet, juntament amb els efectes secundaris que pot ocasionar el tractament, implica que moltes vegades els pacients es vegin sotmesos a canvis en les pautes ARVs.

L'objectiu fixat en el desenvolupament dels fàrmacs ARVs futurs consisteix bàsicament en produir un efecte anti-VIH més potent, durant més temps, amb una dosi farmacològica mínima efectiva, i amb un mínim efecte tòxic per al pacient. Malgrat la gran innovació terapèutica, l'AZT continua essent en l'actualitat un dels components més utilitzats en les combinacions de tractament ARV.

### **8.1.2. Classes de fàrmacs ART disponibles actualment**

L'esquema general del TARGA consisteix en la combinació de dos ITIAN més un tercer fàrmac que pot ser un ITINAN, un IP o un altre ITIAN. Actualment s'estan assajant les possibilitats antiretrovirals d'altres combinacions farmacològiques. Donat el gran ventall de fàrmacs que es comercialitzen actualment, les possibles combinacions terapèutiques són múltiples. L'administració d'una combinació o altra dependrà de l'historial clínic i terapèutic de cada pacient (p.e. de si es tracta d'una teràpia de primera línia o pel contrari és de rescat, de la virèmia i de l'estat immunològic del pacient, dels factors de risc per desenvolupar algun efecte secundari al tractament, del patró de resistència del pacient, etc.). Els fàrmacs ARVs aprovats per la *FDA* i comercialitzats a Europa fins l'any 2010 actuen inhibint diferents enzims vírics que intervenen en diferents punts clau del cicle replicatiu del VIH. Bàsicament es divideixen en tres famílies segons el pas del cicle víric que bloquegen: els inhibidors de la transcriptasa inversa, els inhibidors de la proteasa i els inhibidors de la fusió. A continuació es descriu el mode d'acció de les diferents classes de fàrmacs ARVs:

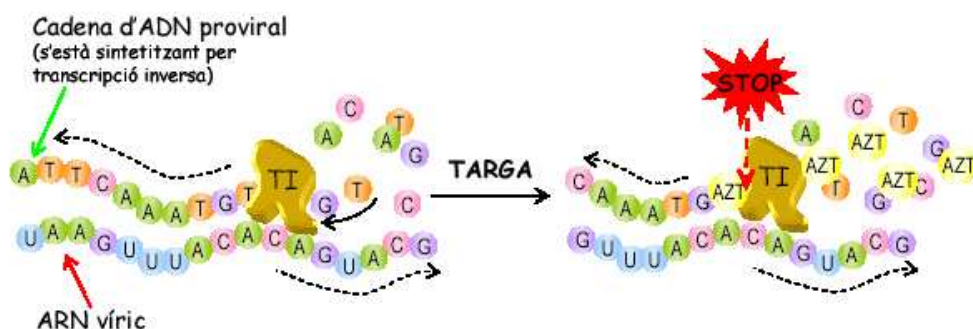
#### **8.1.2.1. Inhibidors de la transcriptasa inversa (ITI)**

Inhibeixen la transcriptasa inversa (TI) del virus, l'enzim ADN polimerasa ARN-dependent, responsable de transformar l'ARN del virus en ADN de doble cadena, per permetre la seva integració al genoma de la cèl·lula infectada. En conseqüència,

s'atura el cicle vital del VIH i el virus no es pot replicar. Es classifiquen en 2 subfamílies segons siguin anàlegs de nucleòsids (o nucleòtids) o no anàlegs.

### A. Inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs de nucleòs/tids (ITIAN/ITIANt)

Els ITIAN són dideoxinucleòsids que actuen com a substractes alternatius de la TI, competint amb els nucleòsids fisiològics adenosina (A), timidina (T), citidina (C) i guanosina (G). Per poder exercir la seva funció s'activen per fosforilació a l'interior de la cèl·lula infectada, gràcies a l'acció de quinases cel·lulars. Els derivats trifosfat (ddNTPs; o dideoxinucleòsids trifosfat) resultants inhibeixen la replicació de l'ADN proviral quan són incorporats per la TI a la cadena d'ADN víric que s'està sintetitzant (**Figura 8**), ja que els manca el grup hidroxil a la posició 3' (3'-OH) de la molècula de ribosa, i en conseqüència, l'enllaç fosfodièster necessari en la polimerització de l'ADN no es pot formar.



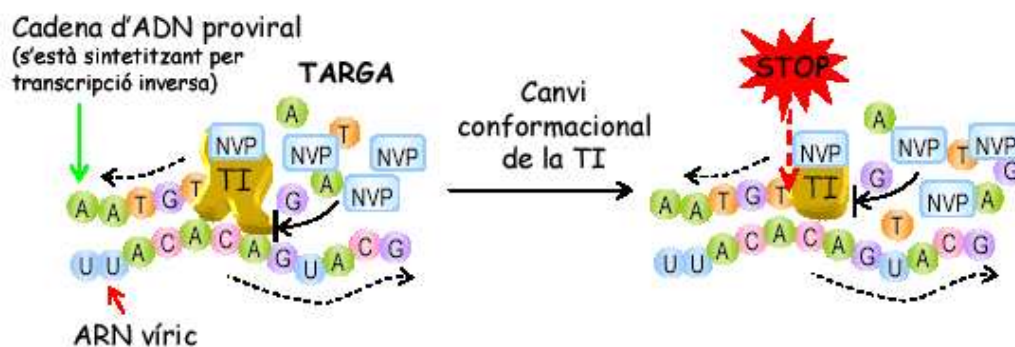
**Figura 8. Mecanisme d'acció dels ITIAN.** L'anàleg del nucleòs de timidina, com per exemple l'AZT, competeix amb els nucleòsids naturals per la transcriptasa inversa. La incorporació d'AZT a la cadena de DNA proviral *nascent* bloqueja la síntesi de DNA, ja que no pot formar l'enllaç fosfodièster necessari per a la polimerització

L'AZT i el d4T són anàlegs de la timidina, i com que competeixen per les mateixes bases la seva combinació conjunta no és recomanada. El ddC, la lamivudina (3TC) i la emtricitabina (FTC) són anàlegs de la citidina, i no se solen combinar conjuntament per la mateixa raó que els ARVs anteriors. El ddl és un anàleg de la inosina i és transformat en dideoxiadenosina abans d'exercir la seva funció. L'abacavir (ABC) és un anàleg de la guanosina. L'únic anàleg de nucleòtid (ITIANt) avui dia disponible contra la infecció pel VIH és el tenofovir disoproxil fumarat (TDF). El TDF és un profàrmac del tenofovir, que actua com un anàleg del nucleòtid adenosina 5'-

monofosfat. A diferència dels anàlegs de nucleòsids, el TDF conté un grup fosfat a la seva estructura i, per tant, només requereix dues fosforilacions per les quinases cel·lulars per generar el metabòlit actiu, tenofovir difosfat. El tenofovir actua de forma similar als anàlegs de nucleòsid, com un fals substrat de l'enzim TI. El TDF s'administra en una sola dosi al dia, presenta una elevada biodisponibilitat, una activitat anti-VIH potent, un perfil de resistència favorable i una gran tolerabilitat, per la qual cosa es considera un nou fàrmac de gran atractiu per a l'ús clínic. Els ITIAN són potents inhibidors de la replicació del VIH, la majoria s'administren en una sola dosi diària i presenten poca interacció amb altres fàrmacs. Per aquest motiu, formen part de la majoria de combinacions ARVs que s'administren en l'actualitat, i solen representar una part important de qualsevol esquema TARGA. D'altra banda, el seu ús continuat ha estat associat a una sèrie d'efectes adversos greus com acidosi làctica, polineuropatia, pancreatitis i lipoatròfia (alteració del greix corporal), que sovint obliga al pacient a modificar la combinació TARGA.

### **B. Inhibidors de la transcriptasa inversa no anàlegs de nucleòsids (ITINAN)**

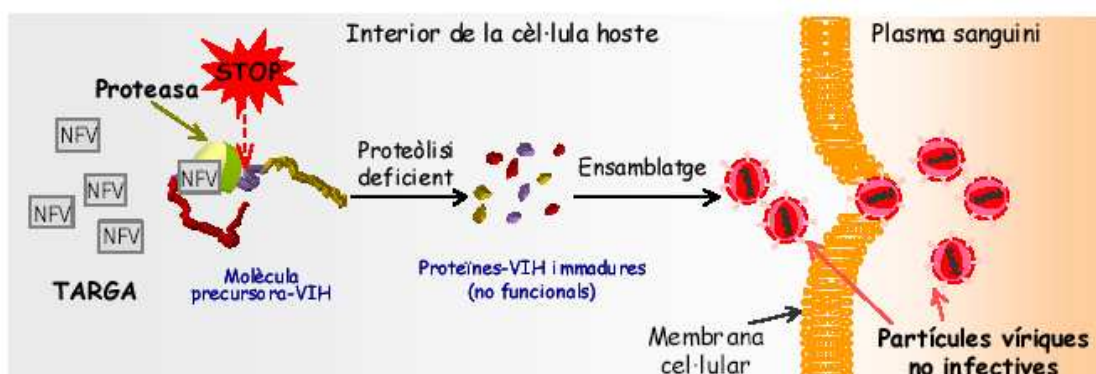
Els ITINAN són compostos no anàlegs dels nucleòsids naturals que, a diferència dels ITIAN no competeixen amb els nucleòsids fisiològics, sinó que interaccionen directament amb la TI del VIH bloquejant la seva activitat enzimàtica. S'uneixen a un lloc pròxim al centre d'unió del substrat, provocant un canvi de conformació en l'enzim que bloqueja el centre catalític, de forma que la polimerització de l'ADN proviral s'inhibeix significativament. A diferència dels ITIAN, els ITINAN no requereixen activar-se a l'interior de la cèl·lula per exercir la seva funció (**Figura 9**). Exerceixen gran activitat anti-VIH en combinació triple amb altres ARVs, especialment amb els ITIAN. Malgrat que el desenvolupament de nous ITINAN no ha estat tan prolífic com els anàlegs, són components habituals en les combinacions TARGA, especialment neviraparina (NVP) i efavirenz (EFV), doncs presenten una posologia simple i un gran perfil de tolerabilitat. Delavirdina (DLV) presenta una prescripció més limitada, donat la seva posologia més complexa. L'ús crònic dels ITINAN no s'ha associat amb efectes secundaris de gran rellevància, però poden generar resistència amb facilitat.



**Figura 9. Mecanisme d'acció dels ITINAN.** La unió d'un ITINAN, com per exemple la nevirapina (NVP) a la transcriptasa inversa provoca un canvi de conformació en l'enzim que bloqueja la seva activitat, i en conseqüència, la síntesi del DNA proviral queda inhibida.

### 8.1.2.2. Inhibidors de la proteasa (IP)

Els IP són compostos que utilitzen la proteasa del VIH com a diana terapèutica. Actuen inhibint la proteasa del virus, que s'encarrega de proteolitzar post-traduccionament les proteïnes víriques per donar lloc a les subunitats funcionals. La inhibició de la proteasa evita, per tant, la maduració i activació de les proteïnes del virus i, en conseqüència, es formaran noves partícules víriques no infectives (**Figura 10**). Són fàrmacs amb una gran eficàcia clínica, per la qual cosa es consideren una part fonamental del TARGA, especialment en pacients prèviament tractats. L'administració dels IP s'associa amb alteració del perfil lipídic, resistència a la insulina i diabetis, que condueixen a un increment del risc cardiovascular. Igualment, s'ha atribuït als IP un possible paper patogènic en el desenvolupament d'un efecte secundari greu de redistribució de greix corporal (lipodistròfia).



**Figura 10. Mecanisme dels IP.** Els IP, com per exemple el nelfinavir (NFV) s'uneixen a la proteasa del VIH alterant la seva activitat proteolítica. En conseqüència, es generen proteïnes immadures, que s'ensamblen donant lloc a partícules víriques que no podran infectar noves cèl·lules.

### 8.1.2.3. Inhibidors de la fusió (IF)

Els IF són fàrmacs d'última generació. Recentment s'ha començat a comercialitzar a Europa el T-20, l'únic prototip d'aquesta categoria actualment disponible en la pràctica clínica. Actuen evitant la fusió entre el virus i la cèl·lula, i per tant bloquegen l'entrada del VIH a l'interior de la cèl·lula diana, evitant així noves infeccions. Es consideren molts importants perquè aquesta família d'ARVs actuen extracel·lularment i, per tant, s'espera que tinguin una baixa citotoxicitat. El T-20 és un pèptid de 36 aminoàcids que s'administra per via subcutània, com la insulina. Presenta una eficàcia limitada, però una gran tolerabilitat. El principal efecte secundari derivat de la seva administració a curt termini és una lleu reacció local a la zona de la injecció. La seva prescripció està especialment indicada en les teràpies de rescat. El desenvolupament i la comercialització del T-20, ha permès obrir una nova etapa en el tractament de la infecció pel VIH, ja que actua per un mecanisme diferent al de la resta de fàrmacs existents.

La investigació per al desenvolupament de nous fàrmacs, més efectius i amb menys efectes tòxics pels pacients, és avui dia una tasca molt activa. En aquest sentit, s'estan estudiant possibles dianes terapèutiques, com el **receptor CD4** que permet la unió del virus a la cèl·lula, i els **co-receptors** necessaris per la fusió virus-cèl·lula que, de la mateixa manera que els IF, actuarien evitant l'entrada del VIH a l'interior cel·lular. Una altra diana en desenvolupament ve representada per la **integrasa del VIH**. Actualment, s'estan assajant fàrmacs inhibidors de la integrasa, que bloquegen la incorporació del genoma víric al nucli. Possiblement, en els propers anys hi hagi disponibles nous fàrmacs, tant de les tres famílies ja existents, com d'altres diferents. També s'està incrementant l'estudi en el camp de la immunoteràpia, que pot suposar una nova alternativa terapèutica en el futur. Consisteix en potenciar una combinació TARGA amb un tractament immunomodulador, basat en la utilització d'interferó, interleucina, hidroxiurea, etc., que potencialment pot produir un efecte ARV addicional.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011



## 8.2. ANNEX II: CARACTERÍSTIQUES GENERALS I ESTRUCTURA DEL VIH

El VIH és un retrovirus animal, del gènere lentivirus, que infecta principalment als limfòcits T CD4+ i macròfags de l'espècie humana, amb l'objectiu de replicar-se i completar el seu cicle vital. El VIH pot entrar a l'organisme per qualsevol de les tres vies principals de transmissió que es coneixen: (I) transmissió sexual: constitueix la principal forma de contagi, que es dona per contacte directe amb les secrecions d'una persona infectada. La major quantitat de virus es troba a la sang i al fluid seminal; (II) transmissió parenteral: per l'ús compartit d'agulles o xeringues, instruments contaminats, transfusió sanguínia, transplantament d'òrgans, etc.; i (III) transmissió vertical: de la mare al fetus (durant l'embaràs, el part o la lactància).

Es coneixen dos tipus de VIH: el VIH-1 i el VIH-2, que presenten d'un 40 al 60% d'homologia proteica. La majoria de casos d'infecció pel VIH ho són pel VIH-1. El VIH-2 és més freqüent a l'oest d'Àfrica i resulta fins a 8 vegades menys transmissible i menys virulent que el VIH-1. Els estudis que es presenten en aquesta Tesi Doctoral fan referència únicament i exclusivament a la infecció pel VIH-1. El VIH-1 es divideix en diferents subtipus, doncs s'han detectat algunes variants víriques (o genotips), que presenten una determinada distribució geogràfica. El subtipus predominant a Europa occidental és el B.

El VIH consisteix en una partícula esfèrica d'uns 100 nm, formada per una estructura de tres capes (**Figura 11**):

**A. Embolcall lipídic:** representa l'estructura més externa. Consisteix en una bicapa lipoproteica que deriva de la cèl·lula infectada, i per tant conté diferents proteïnes que provenen de l'hoste, com antígens d'histocompatibilitat de classe I i II, i algunes molècules d'adhesió, que poden facilitar el contacte amb altres cèl·lules diana. A més, s'integren 72 complexos glucoproteics (gp) virals com *gp120* i *gp41*, que es projecten cap a l'exterior de la partícula vírica.

**B. Càpside o matriu:** consisteix en una estructura intermèdia en forma circular, associada a la part interna de l'embolcall lipídic, i constituïda per la proteïna *p17*.

**C. Nucleocàpside o core:** representa l'estructura més interna amb forma d'icosàedre, constituïda per la proteïna *p24*, a l'interior de la qual es localitza el genoma del virus, les



nucleoproteïnes *p9* i *p7* i la maquinària enzimàtica necessària per a la replicació viral (transcriptasa inversa, integrasa i proteasa).

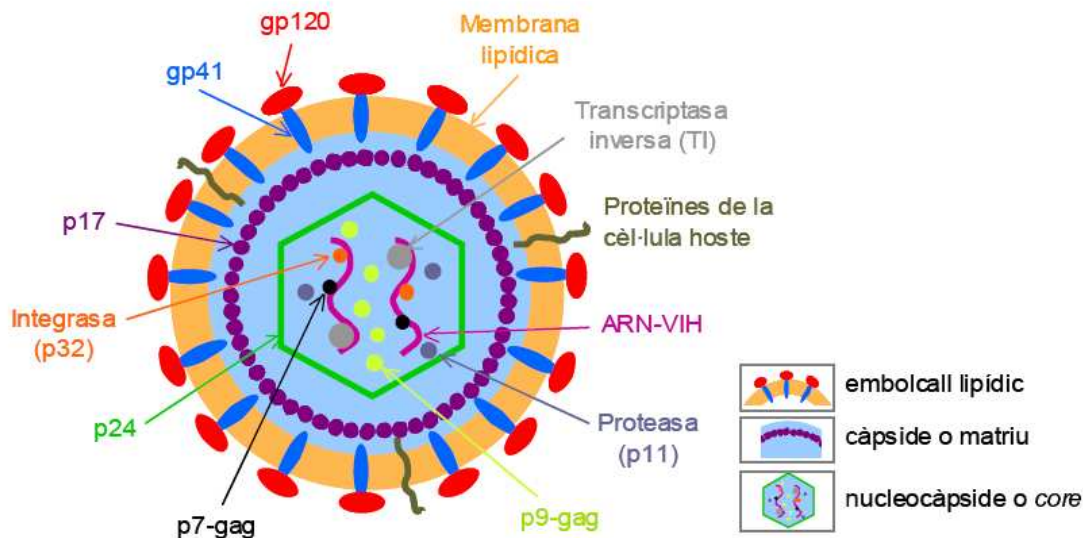


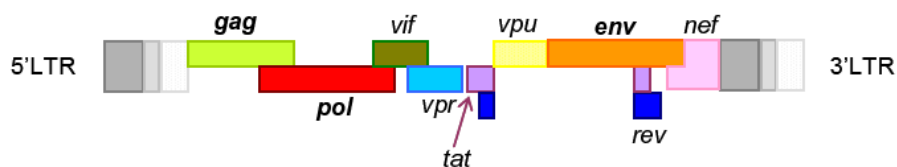
Figura 11. Estructura del VIH.

El genoma del virus està format per dues molècules idèntiques de RNA monocatenari de polaritat positiva de ~9,5 Kb encapsidat al *core*. Com en tots els retrovirus, l'acció enzimàtica de la TI transforma l'ARN víric en DNA proviral bicatenari a l'interior de la cèl·lula hoste, que s'integra al genoma cel·lular per replicar-se. A partir de l'DNA proviral es transcriuen els RNA missatgers (RNAm) que codifiquen les proteïnes virals. Aquestes, juntament amb el RNA genòmic viral nou, constitueix una nova partícula infectiva que emergeix per gemmació a través de la membrana de la cèl·lula infectada. El genoma del VIH està constituït per tres gens estructurals: *gag*, *pol* i *env*, característics de tots els retrovirus, que codifiquen components proteics de la partícula vírica; i per sis gens accessoris reguladors: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* i *vpu*, que codifiquen proteïnes que controlen l'expressió vírica i la infectivitat (**Figura 11**).

El gen *gag* codifica proteïnes de la càpside i el *core*. El gen *env* produeix les glicoproteïnes de l'embolcall lipídic, i el gen *pol* genera la TI i altres enzims necessaris per a la replicació del virus. Els gens *tat* i *rev* codifiquen proteïnes reguladores que estimulen la transcripció de l'ADN proviral a l'interior del nucli. A més, la proteïna *Rev* exporta els RNAm virals del nucli al citosol cel·lular. La proteïna *Nef* realitza diverses funcions, entre les que cal destacar la seva contribució a la patogenicitat del virus,

mitjançant la regulació negativa de l'expressió d'antígens CD4+ i antígens d'histocompatibilitat de classe I i II, la qual cosa representa un mecanisme de protecció contra l'atac citotòxic mediat per les cèl·lules T CD8+, i evita el reconeixement pels limfòcits T CD4+. *Vpr* incrementa el cicle de replicació viral en les cèl·lules infectades, estimulant així la producció de partícules víriques. Igualment, sembla ser important pel transport del DNA proviral cap al nucli. *Vpu* és una proteïna essencial pel procés de gemmació, en el que s'alliberen noves partícules víriques infectives al plasma sanguini. La proteïna *Vif* és important pel transport intracel·lular de molts components vírics. A més, sembla afectar a la morfogènesi viral, i s'associa a la capacitat infectiva del virus extracel·lular.

El genoma del VIH es caracteritza per presentar una elevada taxa de mutació, degut als errors que comet la TI durant la còpia del RNA a DNA i a la capacitat de recombinació que tenen els genomes de dos virus diferents quan co-existeixen en una mateixa cèl·lula. En conseqüència, el VIH exhibeix una extrema variabilitat genètica, que genera una població viral heterogènia, que existeix entre diferents individus i dins d'una mateixa persona. Aquest fet dificulta, d'una banda, el reconeixement i l'eliminació de les partícules víriques per part del sistema immunitari i, d'altra banda, obstaculitza la síntesi d'una vacuna eficaç contra la infecció pel VIH.



**Figura 11. Organització del genoma del VIH.** El genoma del VIH està format per dues molècules de RNA idèntiques de 9,5 Kb, que conté tres gens estructurals (*gag*, *pol* i *env*), comuns a tots els retrovirus, i sis gens reguladors (*vif*, *vpr*, *vpu*, *rev*, *tat* i *nef*). Les regions LTR (long terminal repeat) no codifiquen cap proteïna del virus, i representen els extrems finals del genoma víric, que s'uneixen al DNA de la cèl·lula eucariota un cop integrat al nucli.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

## **9. Material suplementari**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

## **Serum paraoxonase-3 concentration in HIV-infected patients. Evidence for a protective role against oxidation and viral infection**

Gerard Aragonès<sup>a</sup>, Anabel García-Heredia<sup>a</sup>, Marta Guardiola<sup>a</sup>, Anna Rull<sup>a</sup>, Raül Beltrán<sup>a</sup>, Judit Marsillach<sup>b</sup>, Carlos Alonso-Villaverde<sup>c</sup>, Bharti Mackness<sup>a</sup>, Michael Mackness<sup>a</sup>, Juan Pedro-Botet<sup>d</sup>, Pedro Pardo-Reche<sup>e</sup>, Jorge Joven<sup>a</sup>, Jordi Camps<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Catalonia, Spain*

<sup>b</sup> *Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA*

<sup>c</sup> *Servei de Medicina Interna, Hospital Son Llàtzer, 07198 Ciutat de Palma, Mallorca, Spain*

<sup>d</sup> *Servei de Medicina Interna, Hospital del Mar, 08003 Barcelona, Catalonia, Spain*

<sup>e</sup> *Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Catalonia, Spain*

\* Corresponding author. Fax: +34-977-312569.

E-mail address: [jcamp@grupsagessa.com](mailto:jcamp@grupsagessa.com)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

## **ABSTRACT**

Our objective was to investigate the influence of the HIV infection on serum paraoxonase-3 (PON3) concentration, and to assess a possible relationship with lipoprotein-associated alterations, immunological response, and accelerated atherosclerosis. We studied 207 HIV-infected patients and 356 healthy volunteers. Serum PON3 was determined by in-house ELISA. Polymorphisms of the *PON3* promoter were analyzed by the Iplex Gold MassArray™ method. PON3 distribution in lipoproteins was investigated by FPLC. PON3 concentrations were increased (up to 10 times) in HIV-infected patients with respect to the controls ( $p < 0.001$ ), and were inversely correlated with oxidized LDL levels ( $p = 0.038$ ) and CD4 + T cell counts ( $p < 0.001$ ). There was a direct relationship ( $p < 0.001$ ) between PON3 and  $\beta$ -2-microglobulin (a marker of lymphocyte destruction and progression of HIV-infection). Treatment with efavirenz was associated with a normalization of PON3 levels. PON3 was mainly found in HDL in HIV-infected patients, but a substantial amount of the protein was detected in the LDL fraction. The present study shows an important increase in serum PON3 concentration in HIV-infected patients, associated with their oxidative, virological and immunological status, and suggests that PON3 may play a protective role against lipid peroxidation and viral infectivity in this disease.

## **INTRODUCTION**

Human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients often develop long-term metabolic alterations and concomitant atherosclerosis [1,2]. This association has acquired clinical relevance since the introduction of effective therapeutic measures which have changed HIV infection from an acute to a chronic disease, and the consequences of metabolic derangements become more evident over time. In the course of HIV infection there are several key changes in lipoprotein metabolism including increased lipid peroxidation, hypertriglyceridemia and low high-density lipoprotein (HDL) concentration [3]. Among them, changes in HDL are particularly important since HIV-infected patients with higher HDL-cholesterol concentrations appear to have a better HIV disease course than those with lower HDL concentrations [4]. Also, we have previously documented that serum paraoxonase-1 (PON1) activity and concentration are influenced by HIV infection [5], and that PON1 gene polymorphisms are related to the presence of sub-clinical atherosclerosis and CD4+ T cell recovery following treatment [6].



The PON enzyme family comprises 3 members, PON1, PON2 and PON3, whose genes are located adjacent to each other on chromosome 7q21-22 [7]. In mammals, the *PON1* and *PON3* genes are expressed in many cell types [8], and their protein products are found in the circulation bound to HDL [9]. Conversely, PON2 is an intracellular enzyme which is not, however, found in the circulation [10]. All these enzymes are able to retard low-density lipoprotein (LDL) oxidation and cellular oxidative stress [11]. In addition, data obtained from a variety of mouse models of atherosclerosis have consistently shown that human PON1, 2 or 3 expression inhibits, or reverses, the development of atherosclerosis via mechanisms involving the reduction of oxidative stress, the promotion of cholesterol efflux from macrophages, and the normalization of vascular endothelium function [12-15]. The PON family also plays a role in innate immunity and can prevent bacterial infection [16].

Although knowledge on PON1 and PON2 structure and function is rapidly expanding, data from PON3 protein remain elusive. Its gene was identified in 1996 when Primo-Parmo et al. [7] detected a large number of cDNA sequences in the Genome Data Base with significant similarity to, but not identical with, human PON1. The percentage identity among human PON1, PON2, and PON3 genes is high (about 70%) and the genes are believed to derive from a common precursor [11]. Clinical research on PON3 has been hampered by the lack of methods for measurement, but we recently described a high-throughput, reliable enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to analyze PON3 concentration in human serum [17]. The key objective of the present study was to investigate whether serum PON3 concentration is influenced by HIV infection and its associated complications.

## **MATERIAL AND MEDTHODS**

### ***Study population***

From among the HIV-infected patients attending our clinic, 207 (139 men, 68 women; mean age 38 years; range 22 to 66) accepted an invitation to participate in the present study. Of these patients, 122 were co-infected by the hepatitis C virus (HCV). The exclusion criteria were age < 18 years, or renal function impairment defined as creatinine levels higher than 106  $\mu\text{mol/l}$ , or having an AIDS-related opportunistic disease at the time of the study. Forty-five patients had lipodystrophy, defined as the presence of body-fat changes that could be clearly recognized by the patients themselves and confirmed by the physician. These changes included subcutaneous lipoatrophy (hollow cheeks, prominent superficial veins in the limbs, or flattening of the buttocks) and central obesity (increased abdominal girth, breast enlargement, or

dorsocervical fat pad) [18]. Carotid and femoral ultrasound measurements were performed in 178 patients and the intima-media thickness (IMT) was recorded as an estimate of the presence of sub-clinical atherosclerosis, as previously reported [19]. Patients were considered to have atherosclerosis when IMT was  $\geq 0.8$  mm, or when an atheromatous plaque was seen in the analyzed areas of the arteries. The main clinical characteristics of these patients are summarized in Supplementary Table 1. The control group consisted of 356 healthy volunteers who participated in an ongoing epidemiological study being conducted in our geographical area.

A fasting venous blood sample was obtained from all the participants. CD4+ T-cells and CD8+ T-cells were analyzed immediately, and serum and leukocytes were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the other measurements were performed. All the participants provided fully-informed consent to participation in the study on the understanding that anonymity of all data is guaranteed. The study was approved by the *Hospital Universitari de Sant Joan de Reus* Institutional Review Board.

#### **Measurement of serum PON1 and PON3 levels**

Serum PON1 and PON3 concentrations were determined by in-house ELISA using rabbit polyclonal antibodies generated against synthetic peptides with sequences specific to mature PONs. The employed peptides were CRNHQSSYQTRLNALREVQ (specific for PON1) and CRVNASQEVEPVEPEN (specific for PON3). Details of these methods have been previously reported [17,20]. Serum PON1 lactonase activity was analyzed by measuring the hydrolysis of 5-thiobutyl butyrolactone (TBBL) as described [21,22]. Lactonase activity was measured in an assay reagent containing 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.25 mM TBBL and 0.5 mM 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) in 0.05 mM Tris-HCl buffer (pH = 8.0). The change in absorbance was monitored at 412 nm. Activities were expressed as U/l (1 U = 1 mmol of TBBL hydrolyzed per minute). Serum PON1 phosphotriesterase activity was determined by measuring the rate of hydrolysis of paraoxon at 410 nm and  $37^{\circ}\text{C}$  in a 0.05 mM glycine buffer (pH = 10.5) with 1 mM  $\text{CaCl}_2$  [23]. Activities were expressed as U/l (1 U = 1  $\mu\text{mol}$  of paraoxon hydrolyzed per minute).

**Supplementary Table 1.** General characteristics of the HIV-infected patients (n = 207)

<i>Characteristics</i>	<i>Value</i>
Age, years	38 (7)
Gender; % Male	139 (67.1)
Conventional cardiovascular disease risk factors	
Current smoker	163 (78.7)
Hypertension	18 (8.7)
Abnormal fasting glucose	17 (8.2)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.0 (3.2)
Dyslipidemia	75 (36.2)
Risk factors for HIV infection	
Intravenous drug use	117 (56.5)
Male homosexual contact	25 (12.1)
Heterosexual contact	60 (29.0)
Years since HIV diagnosis	5.4 (3.3)
Baseline CD4+ T count; U/mm <sup>3</sup> *	444.4 (286.6)
Baseline CD8+ T count; U/mm <sup>3</sup> *	1084.3 (580.7)
Ratio CD4+ / CD8+ *	0.41 (0.33)
Viral load <200 copies/mL; %	81 (39.1)
AIDS-related disease; %	68 (32.8)
Hepatitis C virus co-infection; %	122 (58.9)
Presence of lipodystrophy; %	45 (21.7)
Antiretroviral therapy; %	
NNRTI	112 (54.1)
PI	95 (45.9)
NRTI	174 (84.0)
Treated with statins; %	4 (1.9)
Treated with fibrates; %	17 (8.2)

NRTI: Nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NNRTI: Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI: Protease inhibitor. Quantitative variables are reported as means and SD (in parentheses). Qualitative variables are reported as n and % (in parentheses).

\* These parameters were analyzed in 177 patients.

### **Biochemical and serological measurements**

Plasma viral load was measured with the COBAS<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> HIV-1 assay (Roche, Basel, Switzerland) and CD4+ T-cell and CD8+ T-cell counts by flow cytometry (Coulter Epics XL-MLC, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Antibodies against HCV, serum  $\beta$ -2-microglobulin (a marker of lymphocyte destruction and progression of HIV-infection [24]), and serum cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol, and apolipoprotein (apo) A-I were measured in an automated analyzer (UniCel<sup>™</sup> DxI 800, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Oxidized LDL levels were measured by ELISA (Mercodia, Uppsala, Sweden).

### ***FPLC lipoprotein fractionation***

PON3 distribution in lipoproteins was assessed by FPLC (Bio-Rad BioLogic DuoFlow 10 system, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA). Sera from 3 HIV-infected patients and 3 non-infected participants were pooled separately. To maximize the possible differences between groups, sera from the HIV-infected patients were chosen to have a PON3 concentration > 20 mg/l. Two-hundred µl from each pool were injected into a Superose 6/300 GL column (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland), and five-hundred µl fractions were collected. Cholesterol, triglycerides, PON1 and PON3 in each fraction were measured as described.

### ***PON3 promoter genotyping***

Genomic DNA was obtained from leukocytes (Puregene DNA Isolation reagent set, Gentra Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *PON3* promoter were analyzed by the Iplex Gold MassArray™ method (Sequenom Inc., San Diego, CA, USA) at the Spanish National Genotyping Center (*Centro Nacional de Genotipado, Universitat Pompeu Fabra*, Barcelona, Spain).

### ***Statistical analysis***

The normality of distributions was determined with the Kolmogorov-Smirnov test. Differences between two groups were assessed with the Student's *t*-test (parametric) or the Mann-Whitney *U* test (non-parametric). Differences between multiple groups were analyzed by the Kruskal-Wallis test. Pearson or Spearman correlation coefficients were used to evaluate the degree of association between variables. Each SNP was tested for Hardy-Weinberg equilibrium using Haploview 4.0 software [25]. Estimates of linkage disequilibrium between SNPs were calculated using Fisher's test. Diagnostic accuracy for the measurement of serum PON3 concentration was calculated with ROC analysis [26]. Results are shown as means and SD (parametric) or as medians and 95% confidence interval (CI; non-parametric). The SPSS 18.0 package was employed for all statistical calculations.

## **RESULTS**

### ***Relationships between serum PON3 concentrations, PON1 status and lipoprotein alterations***

Serum PON3 concentrations were significantly increased in HIV-infected patients with respect to the control group ( $p < 0.001$ ; Fig. 1A). The results of the ROC analysis for serum PON3 concentration measurement are shown in Fig. 1B. The area-under-the

curve (AUC) was 0.94 (95% CI: 0.92 – 0.97;  $p < 0.001$ ), which highlights the remarkable differences in serum PON3 concentrations between patients and controls. We observed a significant inverse relationship ( $r = -0.147$ ;  $p = 0.038$ ) between serum PON3 concentration and oxidized LDL levels (Fig. 1C) in HIV-infected patients. HIV-infected patients had an altered lipoprotein profile with an increase in serum triglycerides concentration and a decrease in cholesterol in all lipoprotein fractions; however, there were no significant changes in serum PON1 concentration or in PON1 lactonase or paraoxonase activities (Table 1). There were no significant associations between serum PON3 concentrations, PON1 status, cholesterol and triglycerides (Supplementary Table 2).

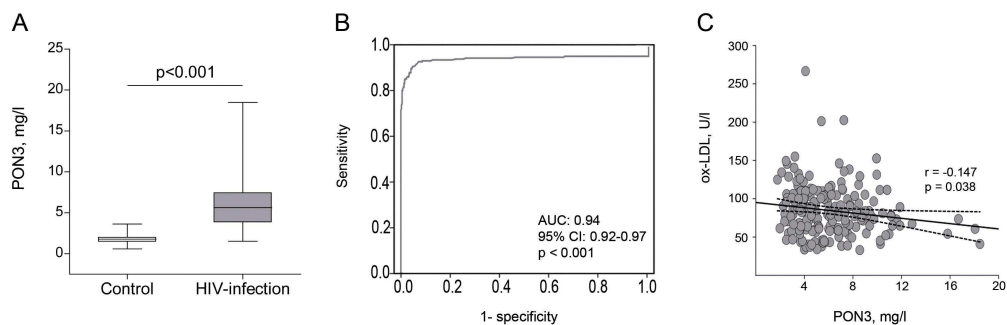
**Table 1.** Lipoprotein-related variables in the control group and in HIV-infected patients

Parameter	Control group (n = 356)	HIV-infected patients (n = 207)	p
Cholesterol (mmol/l)	5.28 (0.98)	4.89 (1.23)	< 0.001
Triglycerides (mmol/l)	1.1 (0.5 – 2.6)	1.5 (0.6 – 8.5)	< 0.001
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.48 (0.39)	1.18 (0.45)	<0.001
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.20 (0.95)	2.75 (0.96)	<0.001
Apolipoprotein A-I (g/l)	1.69 (0.28)	1.38 (0.31)	<0.001
Oxidized LDL (U/l)	84.5 (81.8 – 88.7)	81.5 (40.5 – 145.9)	0.951
PON1 concentration (mg/l)	96.5 (43.6 – 290.5)	98.9 (14.1 – 344.4)	0.858
PON1 lactonase activity (U/l)	5.1 (2.9 – 8.4)	5.2 (2.8 – 8.5)	0.777
PON1 paraoxonase activity (U/l)	278.8 (161.3 – 579.9)	285.7 (153.4 – 679.3)	0.171

Results are presented as means and SD in parentheses (parametric) or as medians and 95% CI in parenthesis (nonparametric).

**Supplementary Table 2.** Correlation coefficients of the regression lines between serum PON3 concentrations and lipoprotein variables in HIV-infected patients

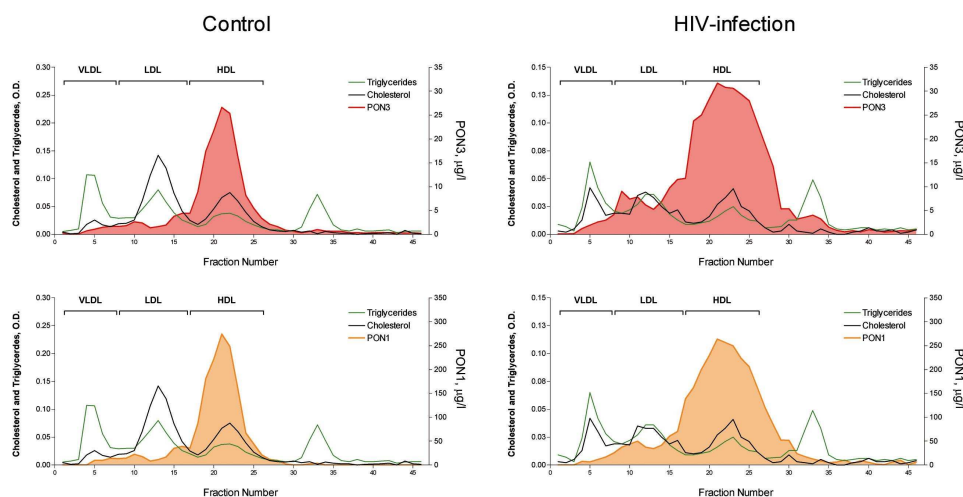
Parameter	Spearman $\rho$	P
Cholesterol	- 0.092	0.223
Triglycerides	- 0.045	0.549
HDL-cholesterol	- 0.048	0.526
LDL-cholesterol	- 0.044	0.583
Apolipoprotein A-I	- 0.111	0.136



**Fig. 1.** (A) Serum PON3 concentrations in control subjects and HIV-infected patients. (B) ROC plot for serum PON3 concentration measurement in HIV-infected and non-infected people. AUC: Area-under-the curve; CI: Confidence interval. (C) Relationship between serum PON3 concentrations and oxidized LDL levels (ox-LDL) in HIV-infected patients.

### FPLC lipoprotein fractionation

In non-infected participants, PON1 and PON3 immunoreactivity was observed almost exclusively in HDL fractions. However, in the HIV-infected pool, a substantial amount of both proteins eluted with the smallest HDL, and with LDL particles (Fig. 2).



**Fig. 2.** FPLC lipoprotein fractionation and PON1 and PON3 lipoprotein distribution in the control and the HIV-infected pools.

### Influence of genotypes on serum PON3 concentrations

The frequency distributions of the selected *PON3* promoter gene polymorphisms are shown in Supplementary Table 3. There were no significant differences between control subjects and HIV-infected patients. These polymorphisms moderately influenced serum PON3 concentrations in the control subjects, but not in the patients' group.

All *PON3* promoter polymorphisms were strongly linked in a single haplotype, and we did not observe any significant differences between patients and controls (Fig. 3).

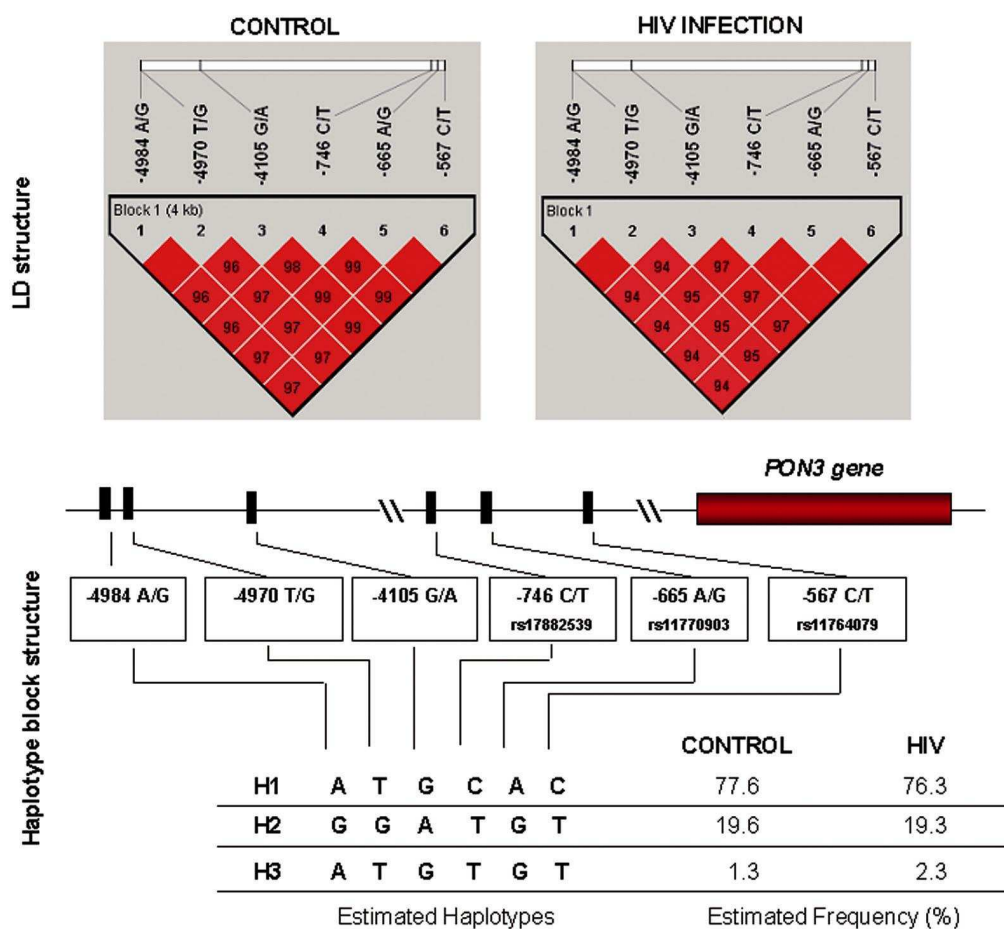


Fig. 3. Linkage disequilibrium (LD) structures across the *PON3* promoter gene, in control subjects and HIV-infected patients, calculated by the Haploview software and labeled by their gene position. Pairwise linkage disequilibrium ( $D'$ ) values are given in each square intersecting for each pair of SNPs and haplotype blocks outlined. There were not any significant differences in the haplotype frequencies between patients and controls.

### ***Relationships between serum PON3 concentrations and the immunological and virological outcomes***

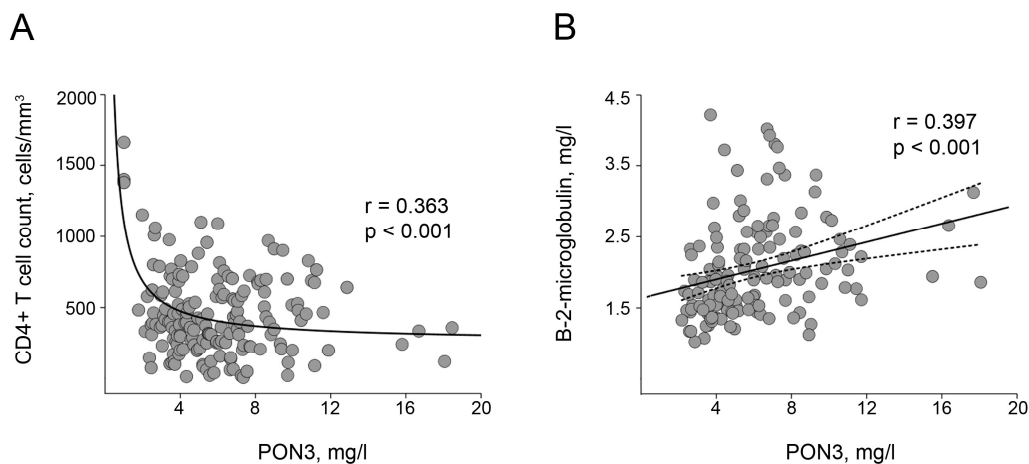
Co-infection with HCV was associated with a significantly higher PON3 concentration [5.8 (2.6 – 11.1) vs. 4.5 (2.4 – 11.6) mg/l, respectively;  $p = 0.024$ ]. There was a significant curvilinear inverse association ( $r = 0.363$ ;  $p < 0.001$ ) between serum PON3 concentration and CD4+ T cell counts (Fig. 4A), but not with CD8+ T cell counts, the CD4+/CD8+ ratio or the plasma HIV-1 viral load (Supplementary Table 4). There was a significant direct linear relationship ( $r = 0.397$ ;  $p < 0.001$ ) between serum PON3 and  $\beta$ -2-microglobulin concentrations (Fig. 4B).



**Supplementary Table 3.** Distribution of PON3 genotypes in the control group and HIV-infected patients

Polymorphism		Genotype frequency (%)		PON3, mg/L	
		Control	HIV	Control	HIV
PON3 <sub>-567</sub> *	CC	59.8	61.7	1.83 (0.45)	5.97 (0.21)
	CT	36.4	32.1	1.68 (0.41)	6.19 (0.31)
	TT	3.8	6.3	1.56 (0.28)	5.51 (0.55)
PON3 <sub>-665</sub> *	AA	59.6	61.7	1.83 (0.45)	5.97 (0.21)
	AG	36.6	32.1	1.68 (0.40)	6.19 (0.31)
	GG	3.8	6.3	1.56 (0.28)	5.51 (0.55)
PON3 <sub>-746</sub> *	CC	59.7	61.5	1.83 (0.44)	5.98 (0.21)
	CT	36.5	31.8	1.67 (0.41)	6.21 (0.32)
	TT	3.8	6.6	1.56 (0.27)	5.45 (0.52)
PON3 <sub>-4105</sub>	GG	61.7	64.8	1.82 (0.45)	5.95 (0.20)
	GA	35.3	30.0	1.68 (0.40)	6.18 (0.32)
	AA	3.0	5.2	1.56 (0.32)	5.89 (0.66)
PON3 <sub>-4970</sub>	TT	62.7	64.5	1.82 (0.45)	5.99 (0.20)
	TG	34.8	30.7	1.69 (0.39)	6.14 (0.32)
	GG	2.5	4.9	1.51 (0.31)	5.54 (0.60)
PON3 <sub>-4984</sub>	AA	62.4	64.6	1.81 (0.46)	5.97 (0.20)
	AG	34.8	30.5	1.69 (0.39)	6.08 (0.32)
	GG	2.8	4.9	1.51 (0.31)	5.54 (0.60)

There were not any significant differences in genotype frequencies between patients and controls. \* These polymorphisms were associated with significant decreases ( $p < 0.05$ ) of serum PON3 concentrations in control subjects, but not in HIV-infected patients.



**Fig. 4.** Relationships between serum PON3 concentrations, CD4+ T cell counts and β-2-microglobulin concentrations in HIV-infected patients.



### ***Influence of treatments on serum PON3 concentrations***

We observed a significant inverse relationship between serum PON3 concentrations and the duration of the antiretroviral treatment in patients given a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor ( $r = - 0.250$ ;  $p = 0.035$ ), but not in patients given protease inhibitors ( $r = - 0.059$ ;  $p = 0.408$ ), or nucleoside reverse transcriptase inhibitors (stavudine:  $r = - 0.242$ ;  $p = 0.133$ ; lamivudine:  $r = - 0.113$ ;  $p = 0.240$ ).

### ***PON3 and sub-clinical atherosclerosis***

When patients were segregated according to whether they had sub-clinical atherosclerosis ( $n = 137$ ) or not ( $n = 41$ ), we did not observe any significant differences in serum PON3 concentrations [5.2 (2.5 – 11.2) vs. 5.4 (2.5 – 11.1) mg/l, respectively;  $p = 0.959$ ]. There was no significant association between serum PON3 concentration and the quantitative value of the IMT ( $r = 0.047$ ;  $p = 0.544$ ).

## **DISCUSSION**

Viral replication and some clinical manifestations of HIV infection involve an imbalance in reduction-oxidation (redox) status and free radical production [27]. Moreover, oxidative stress may also be induced by antiretroviral treatments [28]. PON3 is an enzyme with lactonase activity [29], the physiological function of which is not completely understood, but evidence suggests that it has an antioxidant role by hydrolyzing oxidized lipid peroxides, similarly to PON1 and PON2. Purified human and rabbit PON3 and recombinant PON3 have been shown to decrease macrophage oxidative stress and inhibit the *in vitro* oxidation of LDL [30-33]. The present study pioneeringly revealed a remarkable increase (up to 10 times) in serum PON3 concentration in HIV-infected patients that may be clinically relevant. ROC analysis showed an AUC very close to 1.0, demonstrating a high sensitivity and specificity of serum PON3 measurement in distinguishing between HIV-infected and non-infected people. Interestingly, oxidized LDL levels were not significantly increased, but a significant inverse relationship was observed between their levels in circulation and those of PON3. These data support the concept that PON3 plays a protective role against oxidative stress and increased lipid peroxidation in HIV infection. Whether this increase in circulating PON3 is related to a higher cellular expression is, as present, unknown. However, a recent study observed a similar increase (5 times) in *Pon3* mRNA expression in late gestation, a physiological estate in which oxidative stress is observed [34].

Our results also suggest that PON3 participates in the organism's defence mechanism against HIV infection. This disease is associated with important increases in several acute phase proteins, including C-reactive protein, serum amyloid A, and the virus inhibitory peptide. All these proteins have been shown to possess anti-viral activity *in vitro* [35]. Indeed, HDL is thought to play a role in the innate immune system [36,37], and the finding from the present study of associations between serum PON3,  $\beta$ -2-microglobulin, and CD4+ counts suggests that PON3 may play a role in this function.

The mechanisms by which PON3 could play this putative anti-infective role are unknown. Membrane metabolism is modulated by the efflux of cholesterol to the HDL particle (i.e. HDL particles deplete cholesterol from the cell membrane) and this phenomenon would influence HIV replication since the virus needs the cholesterol rafts of the cell membrane to perform the final viral assembly [38,39]. PON3 has been reported to increase cholesterol efflux from macrophages [32] and, thus, the possibility exists that this enzyme plays a role in pre-empting HIV replication and allowing normal cholesterol turnover from the cell membranes to proceed.

Recently, the study of the relationship between HDL and the course of HIV infection has attracted a great deal of attention from the scientific community. The adaptation of this lipoprotein to a chronic inflammatory and an oxidant state, together with its relationships to HIV-related metabolic disturbances, are areas that are receiving greater attention because, with the new treatments becoming available, these patients have longer survival times and, as such, other physiological perturbations are becoming increasingly relevant. The use of some nucleoside reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors are associated with a lipoprotein profile that is considered atherogenic [40]. On the contrary, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, such as efavirenz, promote anti-atherogenic changes in HDL particles and function, including normalization of size and lipid composition, enhancement of the reverse cholesterol transport, and improvement of the antioxidant capacity [41,42]. In the present study, treatment of HIV-infected patients with efavirenz, but not with other anti-retroviral agents, was associated with a normalization of serum PON3 concentrations, supporting the concept that the expression of this enzyme is enhanced when viral replication is exacerbated and the immune response is hampered.

We did not find any significant differences in genotype or haplotype *PON3* promoter gene polymorphisms between patients and controls, suggesting that genotype does not influence the course of the disease. In our previous report, we observed a moderate influence of some polymorphisms on serum PON3 concentration in the normal population [17], but this is not the case in HIV-infected patients. Possibly, the up-regulation of PON3 expression secondary to the infection masks the small effect of

these polymorphisms. Unlike PON1 [6], PON3 seems not to be associated with the presence of sub-clinical atherosclerosis in HIV-infected patients. This may suggest that the protective effects of these enzymes differs under certain situations, and that perhaps PON1 is more efficient in protecting against the alterations leading to atherosclerosis and PON3 is in some way involved in protection against infection. This is, to the best of our knowledge, the first *in vivo* evidence suggesting such a hypothesis, and warrants further investigation. Another interesting point has been to find a wider lipoprotein distribution of PON1 and PON3 in HIV-infected patients. They are observed in substantial amounts in the smallest HDL and in LDL particles. The accepted concept to-date is that these enzymes are exclusively transported in the circulation by HDL [11], and only associated with other lipoproteins in exceptional circumstances [43]. Perhaps the excess PON3 produced in HIV infection cannot be properly packed in the HDL particles, as the conformation of HDL-associated apolipoprotein A-I leaves little free surface area for other proteins to bind [44]. This may have resulted in some PON3 redistributing to LDL. The physiological implications of this observation require further investigation.

A surprising result from the present investigation was the absence of finding any significant alteration in PON1 activity or concentration in HIV-infected patients. This contradicts our own previous results [5]. We do not know the reason for this discrepancy but, in our previous studies, the differences in PON1 status between patients and controls, although significant, were not quantitatively very important (less than 20% change). Indeed, we already suggested that *PON1* gene polymorphisms are more important than the actual enzyme levels in influencing metabolic and immunological disturbances in HIV infection [6].

In conclusion, the present study reports for the first time an important increase in serum PON3 concentrations in HIV-infected patients which is associated with the oxidative, virological and immunological status of the patients and their treatment with efavirenz. Long-term, prospective studies are needed to further investigate the possible influence of this enzyme on the course of this disease and its possible utility as an analytical biomarker.

## REFERENCES

- [1] Boyd, M.; Reiss P. The long-term consequences of antiretroviral therapy: a review. *J. HIV Ther.* **11**:26-35; 2006.
- [2] Bergersen, B.M. Cardiovascular risk in patients with HIV infection: impact of antiretroviral therapy. *Drugs* **66**:1971-1987; 2006.
- [3] Rose, H.; Woolley, I.; Hoy, J.; Dart, A.; Bryant, B.; Mijch, A.; Sviridov, D. HIV infection and high-density lipoprotein: the effect of disease vs. the effect of treatment. *Metabolism* **55**:90-95; 2006.
- [4] Alonso-Villaverde, C.; Segués, T.; Coll-Crespo, B.; Pérez-Bernalte, R.; Rabassa, A.; Gomila, M.; Parra, S.; Gozález-Esteban, M.A.; Jiménez-Expósito, M.J.; Masana, L. High-density lipoprotein concentrations relate to the clinical course of HIV viral load in patients undergoing antiretroviral therapy. *AIDS* **17**:1173-1177; 2003.
- [5] Parra, S.; Alonso-Villaverde, C.; Coll, B.; Ferré, N.; Marsillach, J.; Aragonès, G.; Mackness, M.; Mackness, B.; Masana, L.; Joven, J.; Camps, J. Serum paraoxonase-1 activity and concentration are influenced by human immunodeficiency virus infection. *Atherosclerosis* **7**:24-31; 2006.
- [6] Parra, S.; Marsillach, J.; Aragonès, G.; Beltrán, R.; Montero, M.; Coll, B.; Mackness, B.; Mackness, M.; Alonso-Villaverde, C.; Joven, J.; Camps, J. Association of paraoxonase-1 gene haplotypes with the immunologic outcome of and metabolic disturbances and atherosclerosis in HIV-infected patients. *J. Infect. Dis.* **201**:627-634; 2010.
- [7] Primo-Parmo, S.L.; Sorenson, R.C.; Teiber, J.; La Du, B.N. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* **33**:498-507; 1996.
- [8] Rodríguez-Sanabria, F.; Rull, A.; Beltrán-Debón, R.; Aragonès, G.; Camps, J.; Mackness, B.; Mackness, M.; Joven, J. Tissue distribution and expression of paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localisation suggest a systemic and coordinated role. *J. Mol. Histol.* **41**:379-386; 2010.
- [9] Deakin, S.P.; Bioletto, S.; Bochaton-Piallat, M.L.; James, R.W. HDL-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **50**:102-109; 2011.
- [10] Ng, C.J.; Wadleigh, D.J.; Gangopadhyay, A.; Hama, S.; Grijalva, V.R.; Navab, M.; Fogelman, A.M.; Reddy, S.T. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **76**: 44444-44449; 2001.
- [11] Camps, J.; Marsillach, J.; Joven, J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **46**:83-106; 2009.
- [12] Mackness, B.; Quarck, R.; Verreth, W.; Mackness, M.; Holvoet, P. Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**:1545-1550; 2006.
- [13] Ng, C.J.; Hama, S.Y.; Bourquard, N.; Navab, M.; Reddy, S.T. Adenovirus mediated expression of human paraoxonase 2 protects against the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol. Genet. Metab.* **89**:368-373; 2006.
- [14] Shih, D.M.; Xia, Y.R.; Wang, X.P.; Wang, S.S.; Bourquard, N.; Fogelman, A.M.; Lusis, A.J.; Reddy, S.T. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ. Res.* **100**:1200-1207; 2007.
- [15] Ng, C.J.; Bourquard, N.; Hama, S.Y.; Shih, D.; Grijalva, V.R.; Navab, M.; Fogelman, A.M.; Reddy, S.T. Adenovirus-mediated expression of human paraoxonase 3 protects against the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**:1368-1374; 2007.
- [16] Camps, J.; Pujol, I.; Ballester, F.; Joven, J.; Simó, J.M. Paraoxonases as potential antibiofilm agents: their relationship with quorum-sensing signals in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:1325-1331; 2011.
- [17] Aragonès, G.; Guardiola, M.; Barreda, M.; Marsillach, J.; Beltran-Debon, R.; Rull, A.; Mackness, B.; Mackness, M.; Joven, J.; Simo, J.M.; Camps, J. Measurement of serum paraoxonase-3 concentration: Method evaluation, reference values and influence of genotypes in a population-based study. *J. Lipid Res.* 2011; Feb 17. [Epub ahead of print].
- [18] Martínez, E.; Mocroft, A.; García-Viejo, M.A.; Pérez-Cuevas, J.B.; Blanco, J.L.; Mallolas, J.; Bianchi, L.; Conget, I.; Blanch, J.; Phillips, A.; Gatell, J.M. Risk of lipodystrophy in HIV-1 infected patients treated with protease inhibitors: a prospective cohort study. *Lancet* **357**:592-598; 2001.

- [19] Alonso-Villaverde, C.; Coll, B.; Parra, S.; Montero, M.; Calvo, N.; Tous, M.; Joven, J.; Masana, L. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation* **110**:2204-2209; 2004.
- [20] Marsillach, J.; Mackness, B.; Mackness, M.; Riu, F.; Beltrán, R.; Joven, J.; Camps, J. Immunochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.* **45**:146-157; 2008.
- [21] Gaidukov, L.; Tawfik, D. The development of human sera tests for HDL-bound serum PON1 and its lipolactonase activity. *J. Lipid Res.* **48**:1637-1646; 2007.
- [22] Marsillach, J.; Aragonès, G.; Beltrán, R.; Caballeria, J.; Pedro-Botet, J.; Morcillo-Suárez, C.; Navarro, A.; Joven, J.; Camps, J. The measurement of the lactonase activity of paraoxonase-1 in the clinical evaluation of patients with chronic liver impairment. *Clin. Biochem.* **42**:91-98; 2009.
- [23] Ferré, N.; Camps, J.; Prats, E.; Vilella, E.; Paul, A.; Figuera, L.; Joven, J. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin. Chem.* **48**:261-268; 2002.
- [24] Savès, M.; Morlat, P.; Chêne, G.; Peuchant, E.; Pellegrin, I.; Bonnet, F.; Bernard, N.; Lacoste, D.; Salamon, R.; Beylot, J. Prognostic value of plasma markers of immune activation in patients with advanced HIV disease treated by combination antiretroviral therapy. *Clin. Immunol.* **99**:347-352; 2001.
- [25] Barrett, J.C.; Fry, B.; Maller, J.; Daly, M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**:263-265; 2005.
- [26] Zweig, M.H.; Campbell, G. Receiver-operating characteristics (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* **39**:561-577; 1993.
- [27] Schwarz, B. Oxidative stress during viral infection: A review. *Free Radic. Biol. Med.* **21**:641-649; 1996.
- [28] Manda, K.R.; Banerjee, A.; Banks, W.A.; Ercal, N. Highly active antiretroviral therapy drug combination induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in immortalized human blood-brain barrier endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **50**:801-810; 2011.
- [29] Draganov, D.I.; Teiber, J.F.; Speelman, A.; Osawa, Y.; Sunahara, R.; La Du, B.N. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J. Lipid Res.* **46**:1239-1247; 2005.
- [30] Draganov, D.I.; Stetson, P.L.; Watson, C.E.; Billecke, S.S.; La Du, B.N. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J. Biol. Chem.* **275**:33435-33442; 2000.
- [31] Reddy, S.T.; Wadleigh, D.J.; Grijalva, V.; Ng, C.; Hama, S.; Gangopadhyay, A.; Shih, D.M.; Lusic, A.J.; Navab, M.; Fogelman, A.M. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**:542-545; 2001.
- [32] Liu, Y.K.; Mackness, B.; Mackness, M. Comparison of the ability of paraoxonases 1 and 3 to attenuate the in vitro oxidation of low-density lipoprotein and reduce macrophage oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **45**:743-748; 2008.
- [33] Shih, D.M.; Xia, Y.R.; Yu, J.M.; Lusic, A.J. Temporal and tissue-specific patterns of *Pon3* expression in mouse: In situ hybridization analysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **660**:73-87; 2010.
- [34] Belteki, G.; Kempster, S.L.; Forhead, A.J.; Giussani, D.A.; Fowden, A.L.; Curley, A.; Charnock-Jones, D.S.; Smith, G.C. Paraoxonase-3, a putative circulating antioxidant, is systematically up-regulated in late gestation in the fetal rat, sheep, and human. *J. Clin. Endocr. Metab.* **95**:3798-3805; 2010.
- [35] Kramer, H.B.; Lavender, K.J.; Qin, L.; Stacey, A.R.; Liu, M.K.; di Gleria, K.; Simmons, A.; Gasper-Smith, N.; Haynes, B.F.; McMichael, A.J.; Borrow, P.; Kessler, B.M. Elevation of intact and proteolytic fragments of acute phase proteins constitutes the earliest systemic antiviral response in HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* **6**:e1000893; 2010.
- [36] Han, R. Plasma lipoproteins are important components of the immune system. *Microbiol. Immunol.* **54**:246-253; 2010.
- [37] Yu, B.L.; Wang, S.H.; Peng, D.Q.; Zhao, S.P. HDL and immunomodulation: an emerging role of HDL against atherosclerosis. *Immunol. Cell Biol.* **88**:285-290; 2010.
- [38] Nguyen, D.H.; Hildreth, J.E. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J. Virol.* **74**:3264-3272; 2000.

- [39] Liao Z.; Graham, D.R.; Hildreth, J.E. Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. **19**:675-687; 2003.
- [40] Tohyama, J.; Billheimer, J.T.; Fuki, I.V.; Rothblat, G.H.; Rader, D.J.; Millar, J.S. Effects of nevirapine and efavirenz on HDL cholesterol levels and reverse cholesterol transport in mice. *Atherosclerosis*. **204**:418-423; 2009.
- [41] Aragonès, G.; Beltrán-Debón, R.; Rull, A.; Rodríguez-Sanabria, F.; Fernández-Sender, L.; Camps, J.; Joven, J.; Alonso-Villaverde, C. Human immunodeficiency virus-infection induces major changes in high-density lipoprotein particle size distribution and composition: the effect of antiretroviral treatment and disease severity. *Clin. Chem. Lab. Med.* **48**:1147-1152; 2010.
- [42] Pereira, S.A.; Batuca, J.R.; Caixas, U.; Branco, T.; Delgado-Alves, J.; Germano, I.; Lampreia, F.; Monteiro, E.C. Effect of efavirenz on high-density lipoprotein antioxidant properties in HIV-infected patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **68**:891-897; 2009.
- [43] Mackness, M.; Bouiller, A.; Hennuyer, N.; Mackness, B.; Hall, M.; Tailleux, A.; Duriez, P.; Delfly, B.; Durrington, P.; Fruchart, J.C.; Duverger, N.; Caillaud, J.M.; Castro, G. Paraoxonase activity is reduced by a pro-atherosclerotic diet in rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**:232-236; 2000.
- [44] Huang, R.; Silva, R.A.; Jerome, W.G.; Kontush, A.; Chapman, M.J.; Curtiss, L.K.; Hodges, T.J.; Davidson, W.S. Apolipoprotein A-I structural organization in high-density lipoproteins isolated from human plasma. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**:416-422; 2011.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

## **Pro-inflammatory High-density Lipoprotein in HIV-infection: The Role of Serum Amyloid A Protein**

Gerard Aragonès<sup>a</sup>, Pedro Pardo-Reche<sup>b</sup>, Raúl Beltrán-Debón<sup>a</sup>, Anna Rull<sup>a</sup>,  
Esther Rodríguez-Gallego<sup>a</sup>, Laura Fernández-Sender<sup>b</sup>, Jorge Joven<sup>a</sup>, Jordi Camps<sup>a</sup>,  
Carlos Alonso-Villaverde<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> *Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Catalonia, Spain*

<sup>b</sup> *Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Catalonia, Spain*

<sup>c</sup> *Servei de Medicina Interna, Hospital Son Llàtzer, 07198 Ciutat de Palma, Mallorca, Spain*

\* Corresponding author. Fax: +34-977-312569.

E-mail address: [calonsov@hsl.es](mailto:calonsov@hsl.es)



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

## **ABSTRACT**

*Background:* The role of pro-inflammatory lipids in systemic immune activation in HIV infection remains largely unknown. We hypothesized that HIV-infected persons on antiretroviral therapy would have pro-inflammatory high density lipoprotein (HDL), and that SAA exacerbate the inflammatory properties of HDL in these persons.

*Methods:* We studied 207 HIV-infected patients and 161 healthy volunteers. Serum SAA concentration was determined by ELISA and its distribution in lipoproteins was investigated by FPLC. A proteomic analysis of isolated HDL particles were analyzed by 2D-DIGE

*Results:* SAA concentrations were increased in HIV-infected patients with respect to the controls ( $p < 0.001$ ), and were inversely correlated with CD4+ T cell counts ( $p < 0.001$ ) and CD4 + T cell counts ( $p < 0.001$ ). There was a direct relationship ( $p < 0.001$ ) between SAA and markers of inflammation (MCP-1 and PCR). Treatment with protease inhibitors was associated with an increase of SAA levels. SAA was only found in HDL particles from in HIV-infected patients.

*Conclusions:* The important increase in SAA in the HDL particles from HIV-infected patients, associated with their virological and immunological status, could suggests that the anti-inflammatory properties of HDL are defective in HIV-infected persons despite treatment that is considered to be virologically successful.

## **INTRODUCTION**

With improved antiretroviral therapies and survival among patients with HIV-infection, cardiovascular disease (CVD) has become an increasingly important cause of morbidity and mortality [1]. The magnitude of the increased CVD risk among persons with HIV-1 infection is unclear, however, as are the relative contributions of viremia, immune activation, antiretroviral therapy (ART), conventional cardiovascular risk factors (such as increasing age and hypertension), and changes in systemic inflammation [1]. Understanding the relative contributions of host, virus, and antiretroviral therapy to risk of CVD in HIV-1 infection will aid in the development of strategies for prevention and treatment.

Inflammation has increasingly been recognized to be pivotal in the initiation and perpetuation of arterial injury leading to atherosclerosis and its complications [2]. Pro-inflammatory high density lipoprotein (HDL) may play a role in this process; higher serum levels of pro-inflammatory HDL are associated with the increased rates of CVD

in certain chronic inflammatory conditions such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and type II diabetes mellitus [3]. While immune activation is a hallmark of HIV-infection, it is unknown if HIV-infection affects levels of pro-inflammatory HDL, or if increases in HDL-cholesterol observed after initiation of ART in longitudinal studies are neutral, atheroprotective or atherogenic in nature [2,4-8].

In view of the systemic immune activation that is not entirely reversed despite effective ART [9,10] and which could therefore be conducive to generating pro-inflammatory lipids, we hypothesized that HIV-infected persons on ART would have pro-inflammatory HDL.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Participants and eligibility***

From among the patients infected with HIV who attended our outpatient clinic, 207 accepted the invitation to participate in the study and provided fully informed consent. Among the exclusion criteria were being <18 years-old, having AIDS-related opportunistic diseases at the commencement of the study, and declining the invitation to participate. For comparisons, we recruited non-infected participants on a previous population-based study (GENUP, n=161), designed to be representative of the population living in our particular geographic area. The Ethics Committee of the Hospital Universitari de Sant Joan de Reus approved the study.

### ***Clinical and Laboratory Measurements***

A detailed clinical record was taken of each subject and a thorough physical examination was performed at interview. Data on age, gender and body mass index (defined as the weight in kilograms divided by the square of the height in meters) were collected. A sample of fasting venous blood was taken for the measurement of glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol (HDL-c), and triglycerides concentrations. The analyses were conducted using standard laboratory methods. The LDL-cholesterol (LDL-c) values were calculated using the Friedewald formula. Plasma HIV-1 RNA viral load was measured with Cobas TaqMan HIV-1 Test (limit of detection was 40 copies/mL; Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA). CD4+ and CD8+ T cell counts were assessed by standard FACscan flow cytometry (Becton-Dickinson, Madrid, Spain). Antibodies against HCV were measured by immunoassay in an automated analyser (Abbott Axsym, Abbott Park IL, USA).

Venous blood samples were collected into EDTA-containing tubes. ApoA-I and ApoA-II concentrations were analysed by a turbidimetric immunoassay (Beckman-Coulter, Fullerton, CA). The concentration of C-reactive protein (hsCRP) was measured by a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (Quantex hs-CRP kit, Biokit), which had a sensitivity of 0.10 mg/L. MCP-1 and SAA concentrations were measured according to the manufacturer's recommendations with an enzyme-linked immunosorbent assay (PeproTech, UK). PON1 activity was analysed by measuring the rate of hydrolysis of paraoxon at 37 °C [9]. PON1 concentration was determined by an in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [10], and oxidized-LDL concentration was measured by enzyme-linked immunoassay (Mercodia, Uppsala, Sweden).

### ***Ultrasound assessment***

Carotid and femoral ultrasound measurements were performed in 178 patients and the intima-media thickness (IMT) was recorded as an estimate of the presence of sub-clinical atherosclerosis, as previously reported [11]. Patients were considered to have atherosclerosis when IMT was >0.8 mm, or when an atheromatous plaque was seen in the analyzed areas of the arteries.

### ***FPLC lipoprotein fractionation***

SAA distribution in lipoproteins was assessed by FPLC (Bio-Rad BioLogic DuoFlow 10 system, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA). Sera from 12 HIV-infected patients and 6 non-infected participants were pooled separately. Two-hundred µl from each pool were injected into a Superose 6/300 GL column (GE Healthcare Europe GmbH, Gattbrugg, Switzerland), and five-hundred µl fractions were collected. Cholesterol, triglycerides and SAA in each fraction were measured as described.

### ***Isolation of HDL***

Blood samples in EDTA-containing tubes were obtained from six healthy volunteers and from twelve HIV-infected patients (six untreated patients and six under antiretroviral therapy at least for 12 months), after an overnight fast. After centrifugation (15 min, 1 500 x g) at room temperature, plasma was obtained. EDTA (1 mg/mL) and sucrose (final concentration 0.5%) were added to prevent HDL oxidation and aggregation, respectively. Samples were ultracentrifuged at  $d = 1.063$  g/mL at 40 000 rpm (100 000 x g) at 10°C for 20 h to obtain apolipoprotein B-containing lipoprotein particles (supernatant). The remaining sample present in the infranatant was adjusted at  $d = 1.210$  g/mL with solid KBr and ultracentrifuged again at 40 000 rpm (100 000 x g) at 10°C for 40 h to obtain HDL particles (supernatant). HDL was then concentrated

using centrifugal filter devices (Amicon Ultra-4; Millipore), and desalted by size-exclusion chromatography on PD-10 columns (Sephadex G-25 M; GE Healthcare) equilibrated with PBS (50 mM, pH 7.4). Protein concentration in the HDL solution was determined with Bio-Rad protein Assay by the method of Bradford. HDL preparations were stored in the dark at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. All ultracentrifugation steps were performed in a Centricon 75 ultracentrifuge (Kontron Instruments, Ltd) using a Kontron TFT 45.6 fixed angle rotor.

### **Sample Preparation and 2-D Differential In Gel Electrophoresis (DIGE)**

The HDL preparations were delipidated with two volumes of ice-cold solution of chloroform:methanol (1:3). The mixture was incubated for 1 hour at  $4^{\circ}\text{C}$ , and centrifuged twice at  $1\ 200 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was discarded and the pellets were dried and resuspended for 1–2 h in 2-D buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS). Finally, proteins were purified and concentrated by precipitation with the 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions, and protein concentration was measured with the 2-D Quant Kit (GE Healthcare). Proteins were purified by precipitation using a 2D Clean-Up Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ) according to the manufacturer's instructions. After precipitation, protein pellets were resuspended in 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 1% Pharmalyte (pH 3-10) before minimal labelling or 0.1% Triton X100 before saturated labelling. Protein concentration was measured using a 2D Quant Kit (GE Healthcare Piscataway, NJ) and Bio-Rad Dc Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Protein samples were prepared and labelled according to the manufacturer's protocol. Briefly, 50  $\mu\text{g}$  of each protein sample was labelled separately at  $0^{\circ}\text{C}$  in the dark for 30 min with 400 pmoles of the N-hydroxysuccinimide esters of cyanine dyes (Cy3 and Cy5 CyDyes; GE Healthcare) dissolved in 99.8% DMF (Sigma). The internal standard, the equimolecular mixture of all the protein extracts, was labelled with the Cy2 CyDye. The labelling reaction was quenched by the addition of 1 mL of a 10-mM L-lysine solution (Sigma) and left on ice for 10 min. After labelling and quenching, the Cy2, Cy3 and Cy5 appropriate samples were mixed, and a volume of 2-D buffer containing 50 mM DTT and 1% IPG buffer was added.

2-D was performed using precast immobilized polyacrylamide gel (IPG) strips (pH 3–11 non-linear, 24 cm length; GE Healthcare) in the first dimension (IEF). Samples were applied by cup-loading onto IPG strips previously rehydrated with 450 mL rehydration buffer (7M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.5% Pharmalyte 3–10, 97 mM De-Streak and minute amounts of bromophenol blue). 150  $\mu\text{g}$  protein was loaded on each IPG strip and IEF was carried out using a commercial horizontal electrophoresis system

(IPGPhor III; GE Healthcare). The proteins were then focused at 53 000 Vh at maximum voltage of 8 000 V and at 50  $\mu$ A per strip. After IEF separation, the strips were immediately equilibrated twice for 15 min with 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS and a trace of bromophenol blue. The first equilibration solution contained 2% DTT (reduction step), and 4% iodoacetamide was added in the alkylation step instead of DTT. Second-dimension SDS-PAGE was performed in a vertical electrophoresis system (Protean Ettan DALT II; GE Healthcare) using 12.5% (26 cm  $\times$  20 cm  $\times$  1 mm) homogeneous polyacrylamide gels, and was carried out at a constant current until the dye front reached the bottom of the gel (45 min at 2 mA/gel and about 5 h at 20 mA/gel) and constant temperature (20°C).

### ***Image acquisition and analysis***

For visualization of protein spots used for identification gels were scanned at 532 nm on Typhoon 9410. Spots selected for protein identification after DeCyder analysis were picked from gels by automatic Ettan Spot Picker (GE Healthcare, Piscataway, NJ) with 2 mm diameter tip.

### ***In-gel digestion of proteins***

Protein spots from flamingo-stained preparative gels were excised manually and then digested automatically using a Proteiner DP protein digestion station (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany). Gel plugs were submitted to reduction with 10 mM DTT (GE Healthcare) in 50 mM ammonium bicarbonate (99.5% purity; Sigma-Aldrich) and alkylation with 55 mM iodoacetamide (Sigma-Aldrich) in 50 mM ammonium bicarbonate. The gel pieces were then rinsed with 50 mM ammonium bicarbonate and ACN (gradient grade; Merck, Darmstadt, Germany) and dried under a stream of nitrogen. Modified porcine trypsin (sequencing grade; Promega) at a final concentration of 13 ng/mL in 50 mM ammonium bicarbonate was added to the dry gel pieces and the digestion proceeded at 37°C for 6 h. Finally, 0.5% TFA (99.5% purity; Sigma-Aldrich) was added for peptide extraction.

### ***MALDI-ToF and MS-MS analysis***

Spots were cut from 2D gels and digested with trypsin (Promega Biotech, Madrid, Spain) at 37°C overnight using a Montage In-Gel Digest<sub>2P</sub> (Millipore, Madrid, Spain), as recommended by the manufacturer. Peptides were dried, resuspended in trifluoroacetic acid, mixed with  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid and analyzed by a MALDI-ToF Voyager DE Pro mass spectrometer (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Spectra were accumulated for 100 laser shots and analyzed using MSFit software version 3.2.1

(52). For MS–MS analysis, pellets of samples from chloroform precipitation were resuspended in  $\text{NH}_4\text{COH}_2$  and digested with trypsin. Next, digested peptides were isolated by C18 reversed-phase columns using ZIPTips (Millipore, Madrid, Spain). Eluted peptides were dried and resuspended in 50% acetonitrile/5% acetic acid in water and applied off-line to the mass spectrometer LCQ Deca XP ion trap (Thermo Finnigan Corporation, Waltham, MA, USA) and sprayed into the LCQ. The MS/MS acquired data searches were performed out with SEQUEST (Thermo Finnigan Corporation) against amino acid sequences listed in the International Protein Index (IPI.fasta) of protein database of the EBI. At least three peptides were found per protein. The IPI was compiled by the EBI to provide a top-level guide to the main databases that describe human, rat and mouse proteomes: SWISS-PROT.

### **Statistical analysis**

The normality of distributions was determined with the Kolmogorov-Smirnov test. Differences between two groups were assessed with the Student's *t*-test (parametric) or the Mann-Whitney *U* test (non-parametric). Differences between multiple groups were analyzed by the Kruskal-Wallis test. Pearson or Spearman correlation coefficients were used to evaluate the degree of association between variables. Results are shown as means and SD (parametric) or as medians and 95% confidence interval (CI; non-parametric). The SPSS 18.0 package was employed for all statistical calculations.

## **RESULTS**

From among the HIV-infected patients attending our clinic, 207 (139 men, 68 women; mean age 38 years; range 22 to 66) accepted an invitation to participate in the present study. Of these patients, 122 were co-infected by the hepatitis C virus (HCV). Forty-five patients had lipodystrophy, The main clinical characteristics of these patients are summarized in Table 1.

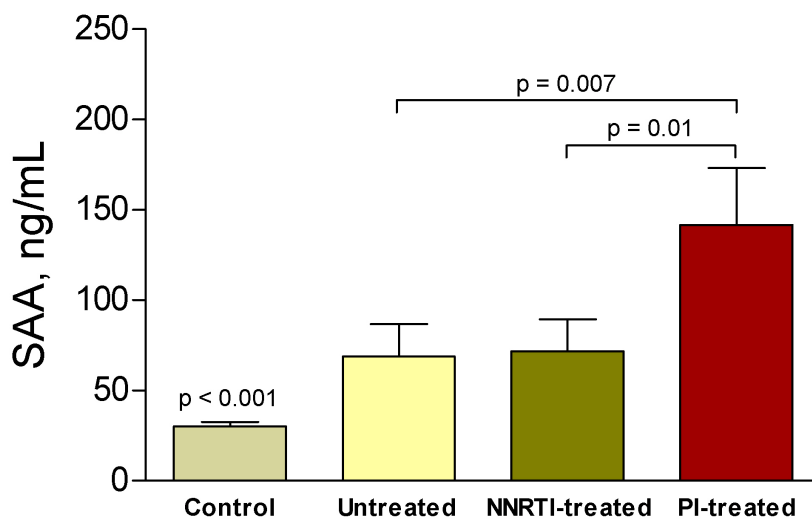
Serum SAA concentrations were significantly increased in HIV-infected patients with respect to the control group ( $p < 0.001$ ; Fig. 1). We observed a significant increase of serum SAA concentrations in patients given a protease inhibitors with respect to patients given non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor ( $p = 0.01$ ; Fig. 1), or untreated patients ( $p = 0.007$ ; Fig. 1).

**Table 1.** General characteristics of the HIV-infected patients (n = 207)

Characteristics	Value
Age, years	38 (7)
Gender; % Male	139 (67.1)
Conventional cardiovascular disease risk factors	
Current smoker	163 (78.7)
Hypertension	18 (8.7)
Abnormal fasting glucose	17 (8.2)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.0 (3.2)
Dyslipidemia	75 (36.2)
Risk factors for HIV infection	
Intravenous drug use	117 (56.5)
Male homosexual contact	25 (12.1)
Heterosexual contact	60 (29.0)
Years since HIV diagnosis	5.4 (3.3)
Baseline CD4+ T count; U/mm <sup>3</sup> *	444.4 (286.6)
Baseline CD8+ T count; U/mm <sup>3</sup> *	1084.3 (580.7)
Ratio CD4+ / CD8+ *	0.41 (0.33)
Viral load <200 copies/mL; %	81 (39.1)
AIDS-related disease; %	68 (32.8)
Hepatitis C virus co-infection; %	122 (58.9)
Presence of lipodystrophy; %	45 (21.7)
Antiretroviral therapy; %	
NNRTI	112 (54.1)
PI	95 (45.9)
NRTI	174 (84.0)
Treated with statins; %	4 (1.9)
Treated with fibrates; %	17 (8.2)

NRTI: Nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NNRTI: Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI: Protease inhibitor. Quantitative variables are reported as means and SD (in parentheses). Qualitative variables are reported as n and % (in parentheses).

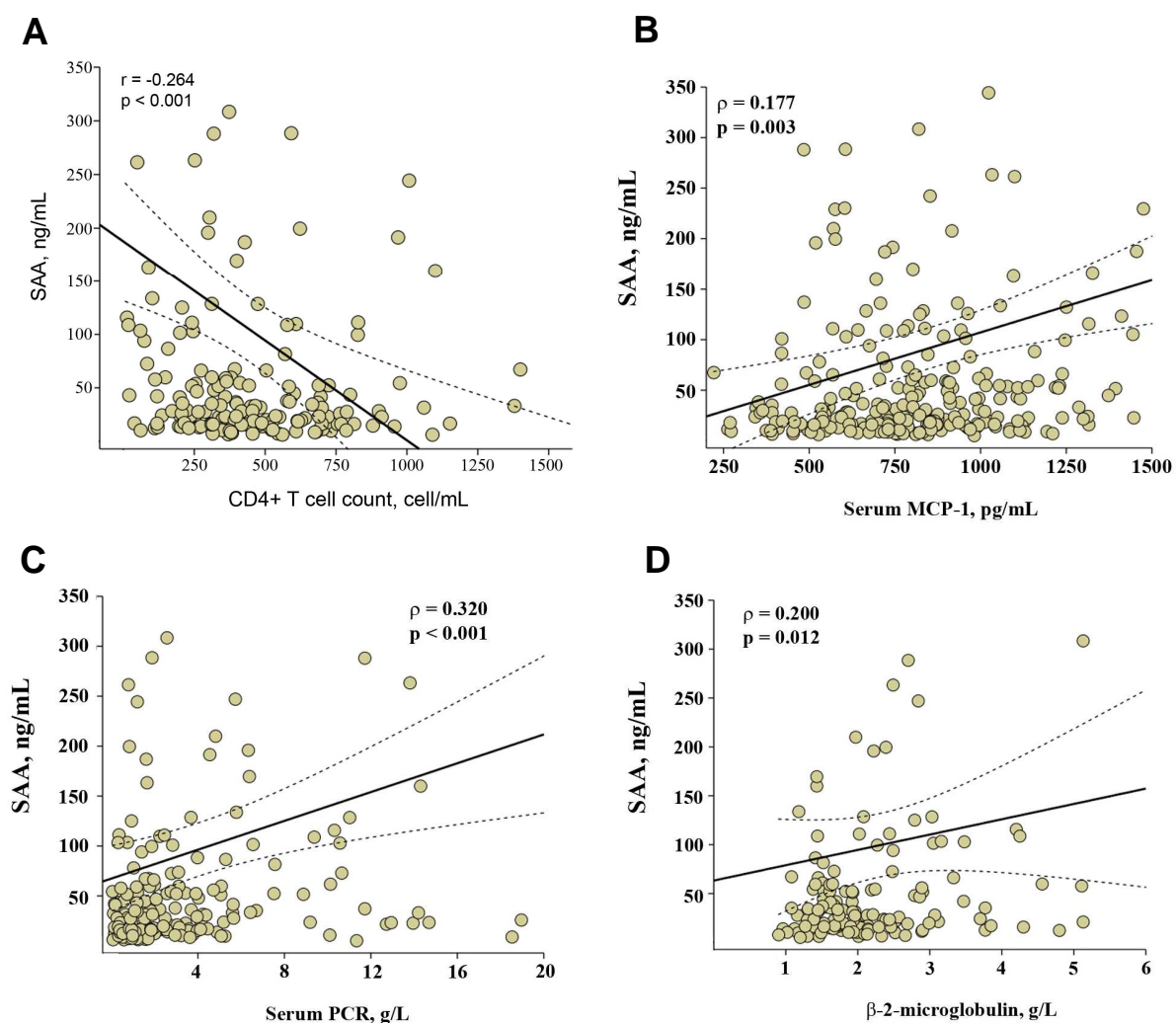
\* These parameters were analyzed in 177 patients.



**Fig. 1.** Serum SAA concentrations in control subjects and HIV-infected patients.



We observed a significant inverse relationship ( $r = -0.264$ ;  $p < 0.001$ ) between serum SAA concentration and CD4+ T cell count (Fig. 2A) in HIV-infected patients, but not with CD8+ T cell counts, the CD4+/CD8+ ratio or the plasma HIV-1 viral load. HIV-infected patients had an altered lipoprotein profile with an increase in serum triglycerides concentration and a decrease in cholesterol in all lipoprotein fractions. There were no significant associations between serum SAA concentrations, ApoA-1, PON1 status, cholesterol and triglycerides. There was a significant direct linear relationship between serum PON3 and MCP-1 ( $r = 0.397$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 2B), PCR ( $r = 0.397$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 2C) and  $\beta$ -2-microglobulin concentrations (Fig. 2D).



**Fig. 2.** Relationship between serum SAA concentration and CD4+ T cell counts, MCP-1, PCR and  $\beta$ -2-microglobulin in HIV-infected patients.

As shown in Fig. 3, in HIV-infected participants, SAA immunoreactivity was observed exclusively in HDL fractions.

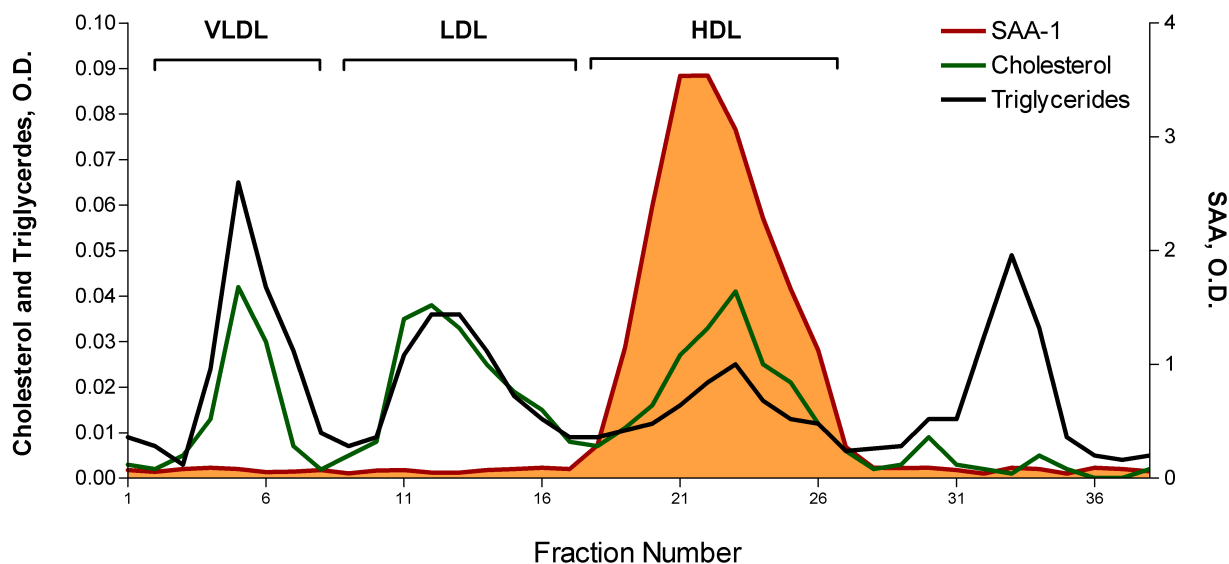
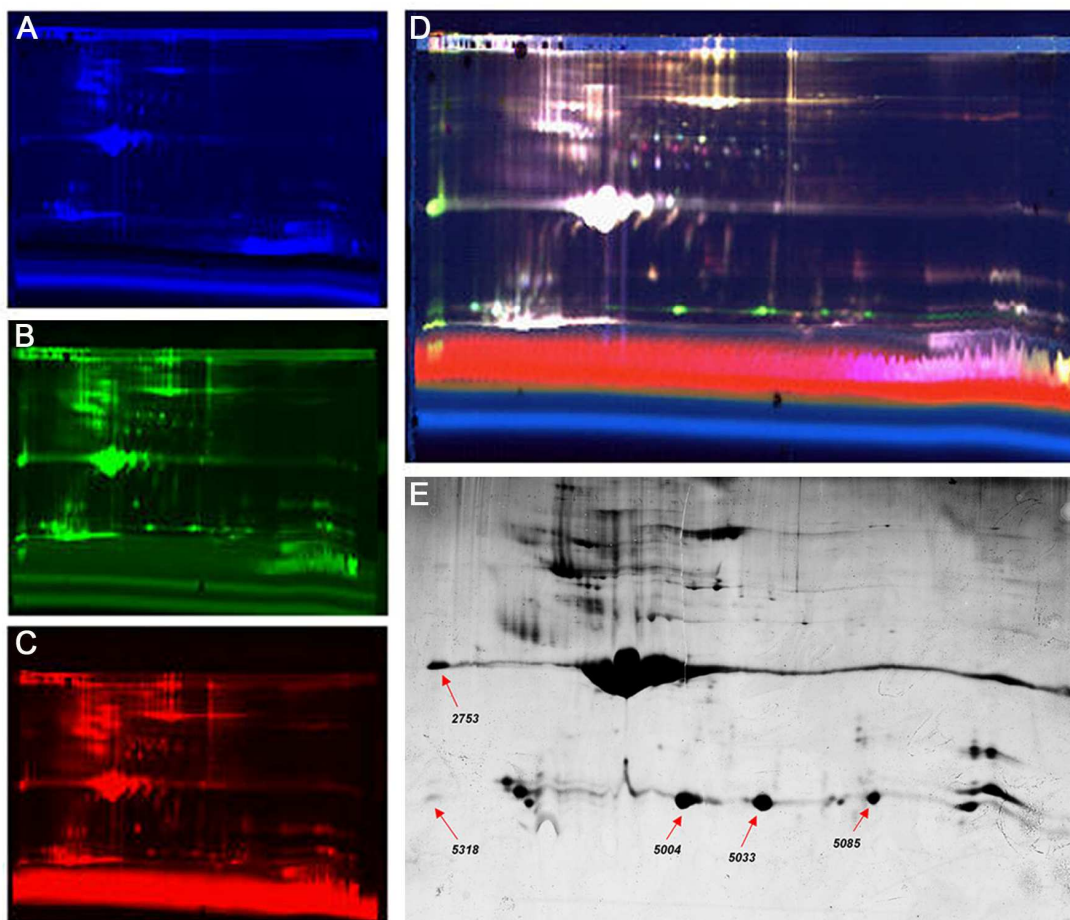


Fig. 3. FPLC lipoprotein fractionation and SAA lipoprotein distribution in HIV-infected patients

When patients were segregated according to whether they had sub-clinical atherosclerosis ( $n = 137$ ) or not ( $n = 41$ ), we did not observe any significant differences in serum SAA concentrations. There was no significant association between serum SAA concentration and the quantitative value of the IMT).

Finally, to define differentially expressed protein in isolated HDL particles between healthy individuals and HIV-infected subjects, this study used 2D-DIGE multiplex proteomic approach. Isolated HDL protein samples were differentially labeled with a fluorescent cyanine dye and co-resolved in the same gel to obtain relative quantitative information. Fig. 4 shows the 2D-PAGE gels images of the co-electrophoresed HDL sample from healthy subject (Fig. 4A), untreated HIV-infected patient (Fig. 4B) and treated HIV-infected patient (Fig. 4C). Analysis of the protein maps revealed that 5 protein spots demonstrated a clear change in volume (at least  $>1.5$ ) between the uninfected and HIV-infected group (Fig. 4 E). These spots were excised and analyzed. From these 5 picked protein spots, 3 of them (spots 5004, 5033 and 5085) were identified confidently by mass spectrometry representing one unique protein: SAA-1.



**Fig. 4.** Two dimensional DIGE analysis of proteins in isolated HDL particles. The images represent proteins spot from non-infected patient (A), untreated HIV-infected patient (B) and treated HIV-infected patient (C), all patients together (D) and flamingo-stained preparative gel where protein spots that showed a >1.50-fold change in abundance are numbered.

## Discussion

Classically, HDL is believed to play an important role in mitigating oxidative stress and inflammation by uptake, processing and disposal of oxidized lipids [2,12]. However, systemic inflammation has been shown to lower this antioxidant and anti-inflammatory activity by transforming HDL to a pro-oxidant, pro-inflammatory acute-phase HDL that enhances the tendency of LDL to induce monocyte chemotaxis [2]. It has been demonstrated that mice that are genetically susceptible to develop atherosclerosis have augmented pro-inflammatory HDL [12,13]. HDL, therefore, not only removes excess LDL-derived cholesterol from peripheral tissues, but also has a major role in mitigating LDL-induced inflammation. Oxidative stress and inflammation are nearly

constant features of HIV-infection and the prevailing inflammatory state likely contributes to the observed reduction of HDL anti-inflammatory function in this population. This could lead to a vicious cycle in which the underlying inflammation and oxidative stress induce HDL dysfunction, which results in further inflammation.

The present study pioneeringly revealed a remarkable increase in serum SAA concentration in HIV-infected patients that may be clinically relevant. These preliminary observations suggest that the composition of HDL are significantly different in HIV-infected persons with respect to non-infected individuals, despite treatment that is considered to be virologically successful, and that standard clinical lipid profile testing may not be an adequate measurement of the risk for CVD in these individuals. In conclusion, to our knowledge this is the first demonstration that HIV infection is associated with a marked increase of SAA on HDL particles.

## REFERENCES

- [1] Currier JS: Update on cardiovascular complications in HIV infection. *Top HIV Med* 2009, 17:98-103.
- [2] Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM: Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004, 17:764-772.
- [3] McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, et al: Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006, 54:2541-2549.
- [4] Buchacz K, Weidle PJ, Moore D, et al: Changes in lipid profile over 24 months among adults on first-line highly active antiretroviral therapy in the home-based AIDS care program in rural Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008, 47:304-311.
- [5] Hsue PY, Hunt PW, Sinclair E, et al: Increased carotid intima-media thickness in HIV patients is associated with increased cytomegalovirus-specific T-cell responses. *AIDS* 2006, 20:2275-2283.
- [6] Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, et al: T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2003, 187:1534-1543.
- [7] Baker JV, Neuhaus J, Duprez D, et al: Changes in Inflammatory and Coagulation Biomarkers: A Randomized Comparison of Immediate versus Deferred Antiretroviral Therapy in Patients With HIV Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011, 56:36-43.
- [8] Kuller LH, Tracy R, Bellosso W, et al: Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med* 2008, 5:e203.
- [9] Ferré, N.; Camps, J.; Prats, E.; Vilella, E.; Paul, A.; Figuera, L.; Joven, J. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin. Chem.* 48:261-268; 2002.
- [10] Aragonès, G.; Guardiola, M.; Barreda, M.; Marsillach, J.; Beltran-Debon, R.; Rull, A.; Mackness, B.; Mackness, M.; Joven, J.; Simo, J.M.; Camps, J. Measurement of serum paraoxonase-3 concentration: Method evaluation, reference values and influence of genotypes in a population-based study. *J. Lipid Res.* 2011; Feb 17. [Epub ahead of print].
- [11] Alonso-Villaverde, C.; Coll, B.; Parra, S.; Montero, M.; Calvo, N.; Tous, M.; Joven, J.; Masana, L. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation* 110:2204-2209; 2004.

- [12] Navab M, Shechter I, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM: Structure and function of HDL mimetics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, 30:164-168.
- [13] Vaziri ND, Moradi H, Pahl MV, Fogelman AM, Navab M: In vitro stimulation of HDL anti-inflammatory activity and inhibition of LDL proinflammatory activity in the plasma of patients with end-stage renal disease by an apoA-1 mimetic peptide. *Kidney Int* 2009, 76:437-444.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI  
INFLAMACIÓ I OXIDACIÓ EN LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA: MODIFICACIONS DE LES  
LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT  
Gerard Aragonès Bargalló  
DL:T. 1353-2011