

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ**

**Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas**



**CONTRIBUCIÓN DEL VIRUS HERPES HUMANO 8 A LA  
PROGRESIÓN DEL GROSOR ÍNTIMA-MEDIA CAROTÍDEO EN  
LAS PERSONAS QUE VIVEN CON VIH**

**TESIS DOCTORAL**

**PRESENTADA POR:**

**FERNANDO LIDÓN PÉREZ**

**DIRIGIDA POR:**

Directora: Prof.<sup>a</sup> Dña. MARÍA DEL MAR MASIÁ CANUTO

Codirector: Prof. D. FÉLIX GUTIÉRREZ RODERO

**ELCHE**

**2020**



La tesis doctoral de D. Fernando Lidón Pérez titulada “CONTRIBUCIÓN DEL VIRUS HERPES HUMANO 8 A LA PROGRESIÓN DEL GROSOR ÍNTIMA-MEDIA CAROTÍDEO EN LAS PERSONAS QUE VIVEN CON VIH” se presenta en formato convencional y como resultado de la investigación se han obtenido los siguientes indicios de calidad:

### **1. Publicaciones en revistas indexadas**

Lidón F, Padilla S, García JA, Fernández M, García J, Ortiz de la Tabla V, Gutiérrez F, Masiá M. Contribution of Human Herpesvirus 8 and Herpes Simplex Type 2 to Progression of Carotid Intima-Media Thickness in People Living With HIV. Open Forum Infect Dis. 2019 Jan 29;6(2):ofz041. doi: 10.1093/ofid/ofz041. eCollection 2019 Feb. PubMed PMID: 30815506; PubMed Central PMCID: PMC6386804.

Dña. Mar Masiá Canuto, directora y Don Félix Gutiérrez Rodero, co-director de la tesis doctoral titulada “CONTRIBUCIÓN DEL VIRUS HERPES HUMANO 8 A LA PROGRESIÓN DEL GROSOR ÍNTIMA-MEDIA CAROTÍDEO EN LAS PERSONAS QUE VIVEN CON VIH”

CERTIFICAN:

Que Don Fernando Lidón Pérez ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “CONTRIBUCIÓN DEL VIRUS HERPES HUMANO 8 A LA PROGRESIÓN DEL GROSOR ÍNTIMA-MEDIA CAROTÍDEO EN LAS PERSONAS QUE VIVEN CON VIH” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos en Sant Joan d’Alacant, a 5 de septiembre de dos mil diecinueve

Fdo. Doña Mar Masiá Canuto

Directora de tesis

Fdo. Don Félix Gutiérrez Rodero

Co-director de tesis

D. Vicente Francisco Gil Guillén, Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

AUTORIZA:

La presentación y defensa como tesis doctoral del trabajo “CONTRIBUCIÓN DEL VIRUS HERPES HUMANO 8 A LA PROGRESIÓN DEL GROSOR ÍNTIMA-MEDIA CAROTÍDEO EN LAS PERSONAS QUE VIVEN CON VIH” realizado por D. Fernando Lidón Pérez bajo la dirección de la Prof. Dña. Mar Masiá Canuto y la co-dirección del Prof. Félix Gutiérrez Rodero.

De acuerdo a la información recibida sobre las evaluaciones previas realizadas en cumplimiento de la normativa general vigente y la propia de la Universidad Miguel Hernández y según lo certificado por las personas que han realizado la tutoría y dirección, la tesis cumple los requisitos para proceder a su defensa pública.

En Sant Joan d’Alacant, a veinticuatro de enero de 2020.

Firmado: Prof. Vicente Francisco Gil Guillén.

Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas.



## FINANCIACIÓN

Parte del trabajo de esta tesis también se basa en la inestimable labor previa desempeñada por otras personas en la recolección de muestras, la adquisición de reactivos y la realización de las pruebas de Laboratorio. Los fondos que se emplearon para ello provienen de las siguientes fuentes de financiación:

- Instituto de Salud Carlos III (PI08/893, PI13/02256, PI16/01740).
- Instituto de Salud Carlos III (INT 14/00207).
- Instituto de Salud Carlos III (CM15/00187).
- Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO UGP-14-197).
- Contrato Predoctoral FISABIO 2015 UGP-15-152).



Si no es apropiado, no lo hagas; si no es verdad, no lo digas. Permite que estos sean tus firmes principios.

Marco Aurelio, Meditaciones





**A todos los miembros de mi familia, que anduvieron conmigo el camino con todos sus avatares y continúan haciéndolo.**





## AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Prof.<sup>a</sup> Mar Masiá y al Prof. Félix Gutiérrez que me dieron la alternativa, mostrándome el camino, me cincelaron y pulimentaron con esmero y paciencia a lo largo de mi formación y durante esta tesis. Al Dr. Sergio Padilla, cuyos consejos me impulsaron y fueron un punto de inflexión. A José Alberto García por su buen hacer y paciencia, sin él no hubiera sido posible esta tesis. Gracias al Dr. José López Escudero, mi primer obrador durante la residencia médica. Gracias al equipo de UEI, Javi, Marta, Yolanda, Fini.

Gracias a mi mentora, la Dra. Antonia Mora, por la guía, inspiración y confianza depositadas y de igual manera al Dr. Óscar Torregrosa, preceptor, amigo y compañero. Una mención especial a Trinidad Vera, por su consejo, pragmatismo, donaire, sostén y aliento en momentos cruciales.

A Vicente Palomar y José Antonio Peral, verdaderos amigos que he conocido gracias a la Medicina. A Gustavo A. García y José Antonio Pizana por seguir ahí desde la infancia.

Gracias a mis padres, Diego y María José, por vuestra dedicación incondicional, educación y valores transmitidos. A mis tíos Juanfran y Laura. A mi hermano Alejandro. A mis primos Juan y Santiago y a mi sobrina Milena que serán las futuras generaciones. Gracias a Mari Carmen por su paciencia y tolerancia. Por último, gracias a mi abuelo Juan, que hizo de nodriza y no está físicamente con nosotros pero sí en el recuerdo.



## ÍNDICE

ÍNDICE .....	15
ÍNDICE DE TABLAS .....	19
ÍNDICE DE FIGURAS .....	21
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	23
RESUMEN .....	25
SUMMARY .....	27
1. INTRODUCCIÓN .....	29
1.1. Los eventos no sida en las personas con virus de la inmunodeficiencia humana.....	29
1.2. El grosor íntima-media carotídeo y el paciente con VIH.....	29
1.3. La inflamación crónica como causa subyacente de los eventos no sida...	30
1.4. Las coinfecciones y su influencia sobre los eventos no sida.....	32
1.5. El virus herpes humano 8.....	33
1.5.1.Prevalencia de infección por el virus herpes humano 8.....	34
1.5.1.1. El virus herpes humano 8 en la población general incluyendo PVVIH y VIH negativos .....	36
1.5.1.2. El virus herpes humano 8 en los hombres que tienen sexo con hombres.....	36
1.5.1.3. El virus herpes humano 8 en el hombre respecto a la mujer .....	37
1.5.2. Patogenia del virus herpes humano 8 .....	38
1.5.3. Diagnóstico de laboratorio del virus herpes humano 8.....	41
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	43
3. HIPÓTESIS.....	45
4. OBJETIVOS.....	47
4.1. Objetivo general.....	47
4.2. Objetivos específicos .....	47
	15

5. METODOLOGÍA.....	49
5.1. Diseño del estudio .....	49
5.2. Población del estudio.....	49
5.3. Registro de los datos .....	50
5.4. El grosor íntima-media carotídeo.....	51
5.5. Los factores de riesgo cardiovascular clásicos. ....	54
5.6. Estudio microbiológico y biomarcadores.....	56
5.7. Análisis estadístico. ....	58
5.7.1. Factores asociados con la coinfección por virus herpes humano 8	58
5.7.2. La progresión del grosor-íntima carotídeo.....	58
5.7.3. Aparición de nuevas placas y eventos cardiovasculares.....	59
5.7.4. Potencia del estudio.....	59
6. RESULTADOS.....	61
6.1. Características basales y clínicas de los pacientes del estudio.....	61
6.2. Características basales y clínicas de los infectados por virus herpes humano 8 .....	64
6.3. Factores asociados a la progresión del grosor íntima-media carotídeo.....	68
6.4. Características basales de los pacientes en los que se observó incremento del número de placas.....	75
6.5. Factores asociados al incremento del número de placas respecto al inicio del estudio.....	75
6.6. Características de los pacientes que tuvieron eventos vasculares durante el estudio.....	77
6.7. Factores asociados a la aparición de eventos vasculares durante el estudio.....	78
6.8. Factores asociados a la aparición de eventos vasculares y/o incremento del número de placas.....	79
6.9. Eventos vasculares hasta 2018 .....	81
6.10. Pacientes que fallecieron durante el transcurso del estudio y después de su finalización .....	81
7. DISCUSIÓN .....	83
7.1. Población del estudio.....	84
7.2. Efecto de las coinfecciones por virus herpes humano 8 y virus herpes simple 2 en la progresión de la aterosclerosis subclínica.....	84
7.3. Influencia de resto de coinfecciones en la progresión de la aterosclerosis subclínica .....	85

7.4. Efecto de la inflamación sobre la aterosclerosis asintomática.....	86
7.5 Efecto de los factores de riesgo tradicionales en la progresión de la aterosclerosis subclínica .....	88
7.6. Limitaciones y fortalezas del estudio.....	88
8. CONCLUSIONES.....	91
9. BIBLIOGRAFÍA.....	93
10. ANEXO: PUBLICACIONES.....	101





## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b>	Algunas enfermedades relacionadas con los gammaherpesvirus: virus herpes humano 8 y virus de Epstein-barr.....	34
<b>Tabla 2:</b>	Metaanálisis que han estudiado la prevalencia de virus herpes humano 8.....	35
<b>Tabla 3:</b>	VARIABLES dependientes en el estudio.....	51
<b>Tabla 4:</b>	VARIABLES independientes o predictoras (i): demográficas y factores de riesgo cardiovascular .....	55
<b>Tabla 5:</b>	VARIABLES independientes o predictoras (ii): relacionadas con el vih y sus coinfecciones .....	57
<b>Tabla 6:</b>	Características basales de los pacientes con virus herpes humano 8 ...	62
<b>Tabla 7:</b>	Modelo lineal general binomial mixto con enlace clog-log o que muestra los factores asociados con infección por el virus herpes humano 8.....	67
<b>Tabla 8:</b>	Modelo lineal general mixto univariante que muestra factores asociados con la progresión de grosor íntima-media carotídeo en el bulbo.....	71
<b>Tabla 9:</b>	Modelo lineal general mixto multivariante ajustado mostrando los factores asociados a la progresión de grosor íntima-media carotídeo en el bulbo.....	73
<b>Tabla 10:</b>	Características basales de los pacientes con incremento del número de placas.....	76
<b>Tabla 11:</b>	Modelo lineal general mixto multivariante que muestra factores asociados con empeoramiento del número de placas .....	77
<b>Tabla 12:</b>	VARIABLES basales de los pacientes que tuvieron eventos vasculares durante el seguimiento.....	78
<b>Tabla 13:</b>	Modelo lineal general mixto multivariante que muestra factores asociados con los eventos vasculares producidos durante el estudio ...	79
<b>Tabla 14:</b>	Modelo lineal general mixto univariante que muestra factores asociados con los eventos vasculares y/o aparición de nuevas placas producidos durante el estudio.....	80

<b>Tabla 15:</b> Modelo lineal general mixto multivariante que muestra factores asociados con los eventos vasculares y/o aparición de nuevas placas producidos durante el estudio.....	81
<b>Tabla 16:</b> Eventos vasculares durante el seguimiento de los pacientes coinfectados con el virus herpes humano 8.....	82
<b>Tabla 17:</b> Pacientes fallecidos durante el estudio y hasta el año 2018.....	82



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Eventos sida y no sida en los pacientes infectados por VIH.....	31
<b>Figura 2:</b>	Recolección de los datos y fases del estudio .....	50
<b>Figura 3:</b>	Medida del grosor íntima-media carotídeo en arteria carótida común derecha (arriba) y bulbo izquierdo (abajo).....	52
<b>Figura 4:</b>	Medida del Grosor íntima-media carotídeo en bulbo carotídeo izquierdo.....	53
<b>Figura 5:</b>	Coinfecciones dentro del total de pacientes del estudio .....	63
<b>Figura 6:</b>	Coinfecciones entre el virus herpes humano 8 con el virus de la hepatitis C, el virus varicela-zóster y el citomegalovirus .....	65
<b>Figura 7:</b>	Proteína C ultrasensible en los pacientes con infección por el virus herpes humano 8 .....	67
<b>Figura 8:</b>	Proteína C ultrasensible según el tiempo de supresión virológica .....	68
<b>Figura 9:</b>	Resumen de los modelos que incluyen virus herpes humano 8 y herpes simple tipo 2.....	69
<b>Figura 10:</b>	Mediana (Q1-Q3) de la progresión del bulbo según el orden de medición del Grosor íntima-media carotídea en los pacientes con infección del virus herpes humano 8.....	70
<b>Figura 11:</b>	Mediana de la progresión del bulbo según la edad en los pacientes con infección por virus herpes humano 8 representado con un suavizado del diagrama de dispersión o smoothing.....	70



## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>ARAII:</b>	antagonistas de la angiotensina II
<b>ADN:</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ARN:</b>	ácido ribonucleico
<b>CDC:</b>	centros para la prevención y control de enfermedades de los Estados Unidos
<b>CMV:</b>	citomegalovirus
<b>COX-2:</b>	mediador de inflamación celular ciclooxigenasa 2
<b>DM2:</b>	diabetes mellitus 2
<b>ECM:</b>	enfermedad de Castleman multicéntrica
<b>ENOS:</b>	eventos no sida
<b>ETS:</b>	enfermedad de transmisión sexual
<b>GIMC:</b>	grosor íntima-media carotídeo
<b>HDL:</b>	colesterol: High density lipoprotein o lipoproteínas de alta densidad
<b>Hs-CRP:</b>	<i>high-sensitivity C Reactive Protein</i> o proteína C reactiva ultrasensible
<b>HSH:</b>	hombres que tienen sexo con hombres
<b>HTA:</b>	hipertensión arterial
<b>IECA:</b>	inhibidores de la enzima convertora de la angiotensina
<b>IL:</b>	interleucina
<b>vIL6:</b>	interleucina viral 6
<b>IM:</b>	infarto de miocardio
<b>IMT:</b>	<i>intima-media thickness (GIM o Grosor íntima media)</i>
<b>IP:</b>	inhibidores de la proteasa

<b>INSTI:</b>	inhibidores de la integrasa
<b>ITINAN:</b>	inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos
<b>LDL:</b>	lipoproteínas de baja densidad, <i>low density lipoprotein</i>
<b>PCR:</b>	reacción en cadena de la polimerasa, <i>polimerase chain reaction</i>
<b>PCRUS:</b>	proteína C reactiva ultrasensible
<b>PEL:</b>	linfoma primario de cavidades
<b>PVVIH:</b>	personas que viven con el VIH
<b>SIDA:</b>	síndrome de la inmunodeficiencia humana adquirida
<b>SK:</b>	sarcoma de Kaposi
<b>STAT3:</b>	transductor de señal y activador de la transcripción 3, <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
<b>TAR:</b>	tratamiento antirretroviral
<b>UDVP:</b>	usuarios de drogas por vía parenteral
<b>vCCL:</b>	ligando de quimioquina CC viral
<b>VEGF:</b>	factor de crecimiento endotelial vascular, <i>vascular endothelial growth Factor</i>
<b>vFLIP:</b>	proteína viral inhibitoria FLICE
<b>VEB:</b>	virus de Epstein-Barr
<b>VHC:</b>	virus de la hepatitis C
<b>VHH-8:</b>	virus herpes humano 8
<b>VHS-2:</b>	virus herpes simple 2
<b>VHSK:</b>	virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi o virus herpes humano 8
<b>VIH:</b>	virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VVZ:</b>	virus varicela-zóster

## RESUMEN

Las personas que viven con el VIH (PVVIH) tienen un mayor riesgo de desarrollo de enfermedad aterosclerótica que la población general. Aunque los mecanismos por los que esto ocurre todavía no han sido definitivamente identificados, se han implicado los factores de riesgo cardiovascular tradicionales, la toxicidad asociada al tratamiento antirretroviral y la existencia de un estado pro-inflamatorio crónico asociado a la replicación viral persistente y a las coinfecciones por otros microorganismos, entre otros motivos. El virus herpes humano-8 (VHH-8) es un virus linfotrópico y vasculotrópico que podría contribuir al aumento de la aterogénesis. Con el fin de conocer la evolución de la aterosclerosis subclínica y la contribución del VHH-8 en esta población, se ha diseñado un estudio longitudinal prospectivo en una cohorte monocéntrica de pacientes hombres que tienen sexo con hombres (HSH) con infección por VIH y carga viral suprimida. Se ha evaluado la progresión de la aterosclerosis a través del grosor íntima-media carotídeo (GIM carotídeo o GIMC) medido con ecografía durante un período de 8 años y su relación con la coinfección por VHH-8 y otros posibles factores, incluyendo los factores tradicionales de riesgo cardiovascular y biomarcadores de inflamación en PVVIH para así identificar los factores asociados a su progresión.



## SUMMARY

People living with HIV (PLWH) have a higher risk of developing atherosclerotic disease than the general population. Although the mechanisms by which this occurs have not yet been definitively identified, the traditional cardiovascular risk factors, the toxicity associated with antiretroviral treatment, the existence of a chronic pro-inflammatory state associated with persistent viral replication and to coinfections by other microorganisms, among other causes have been implicated. Human herpesvirus 8 (HHV-8) is a lymphotropic and vasculotropic herpesvirus with potential pro-atherogenic effects. In order to know the evolution of subclinical atherosclerosis and the contribution of coinfection by VHH-8 in this population, a prospective longitudinal study has been designed in a monocentric cohort of patients living with HIV including men who have sex with men (MSM). We evaluated the progression of atherosclerosis through the carotid intima-media thickness (carotid IMT or CIMT) measured with ultrasound over a period of 8 years. We analysed the relationship among CIMT and VHH-8 coinfection and other factors, including traditional cardiovascular risk factors and inflammatory biomarkers in virologically suppressed people living with HIV (PLWH) to identify the factors associated with the progression of CIMT.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Los eventos no sida en las personas con virus de la inmunodeficiencia humana

La situación de las personas que viven con el VIH (PVVIH) ha sufrido numerosos cambios respecto a los primeros casos descritos de Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (sida) y el descubrimiento del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Con la introducción de la terapia antirretroviral (TAR) combinada se han reducido drásticamente las complicaciones oportunistas asociadas directamente con la inmunodeficiencia y, consecuentemente, la mortalidad de las PVVIH. En los últimos años, en los países desarrollados, la morbilidad y la mortalidad por los denominados eventos no sida (ENOS), no atribuibles directamente a la inmunodeficiencia, como la patología cardiovascular, ha comenzado a sobrepasar a la de los eventos relacionados con el sida como las infecciones y tumores de carácter oportunista (1–4).

Por otro lado, como varias publicaciones se han encargado de remarcar, la incidencia de eventos vasculares en las PVVIH es más elevada que en las personas que no viven con la infección, independientemente de los factores de riesgo tradicionales, lo que ha hecho que actualmente se contemple la infección por el VIH como un factor de riesgo cardiovascular en sí mismo (1,5–9).

## 1.2. El grosor íntima-media carotídeo y el paciente con VIH

Se han propuesto algunos marcadores subrogados con la intención de valorar la patología vascular preclínica en las PVVIH. Uno de los marcadores más utilizados para valorar la ateromatosis asintomática es el grosor íntima-media carotídeo (GIMC) o *intima-media thickness* (IMT). El GIMC se mide mediante ecografía, y su objetivo es valorar de manera indirecta y mediante el estudio por la imagen la aterosclerosis o induración arterial producida por la placa de ateroma. En las investigaciones donde

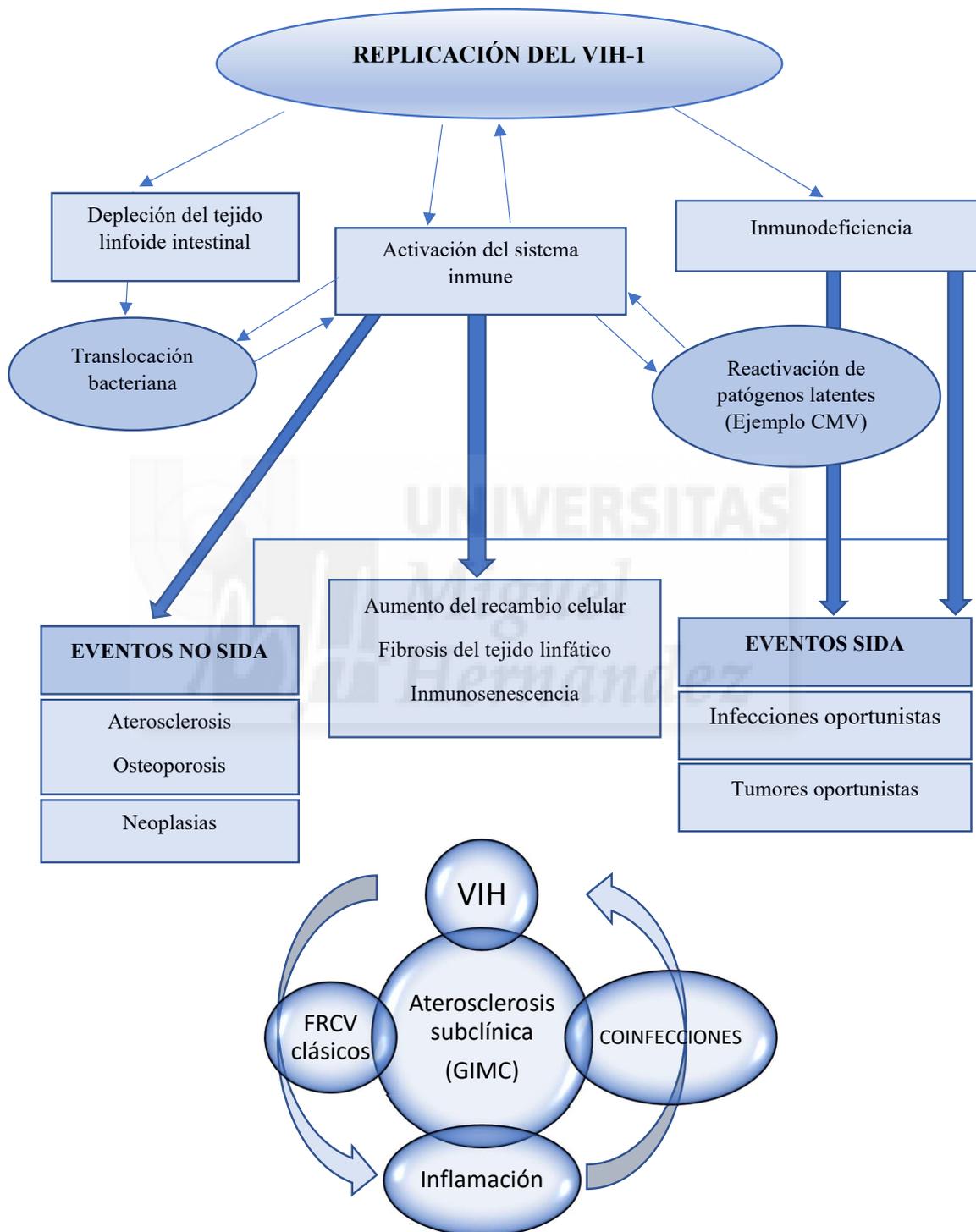
se ha analizado el GIMC se ha descrito la asociación con el riesgo de desarrollar futuros eventos cardiovasculares en la población general (10,11). Además, en numerosos estudios también se ha descrito una mayor prevalencia de aterosclerosis subclínica en los pacientes que tienen infección por VIH que en la población no infectada (3,11–17) y una mayor progresión del GIMC, sobre todo, a nivel de la bifurcación de la carótida (14).

### **1.3. La inflamación crónica como causa subyacente de los eventos no sida**

En la morbilidad de las PVVIH también influyen procesos que no estarían de inicio relacionados directamente con la infección por el VIH (Figura 1). Algunas de estas patologías serían las enfermedades cardiovasculares, renales, óseas y neoplásicas entre otras (18).

En comparación con la población general, las PVVIH tienen un mayor riesgo de eventos cardiovasculares que se ha relacionado con diferentes causas, además de con los factores de riesgo cardiovascular tradicionales, como la TAR y la inflamación crónica asociada al VIH y la activación inmunitaria (19). Se ha sugerido que la presencia de un estado inflamatorio persistente puede ser un mecanismo central en la patogénesis de la enfermedad por el VIH. La inflamación residual contribuiría al desarrollo de algunas de estas complicaciones a pesar incluso de un TAR eficaz en el que no se detecte carga viral en sangre (18,19). Desde hace años se considera que la inflamación y la activación inmune sostenida están involucradas en la patogénesis de la aterosclerosis (20).

**Figura 1:** Eventos sida y no sida en los pacientes infectados por VIH (adaptada de Gutiérrez, F.)



CMV, citomegalovirus; GIMC, grosor íntima-media carotídeo; FRCV, factores de riesgo cardiovascular; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana adquirida.

#### 1.4. Las coinfecciones y su influencia sobre los eventos no sida

La coinfección por otros patógenos es uno de los mecanismos sugeridos que pueden contribuir a esta inflamación residual. La coinfección con virus de la familia herpesviridae es muy prevalente entre las PVVIH. Esta familia de virus ha estado particularmente implicada en la patogénesis de la aterosclerosis (21). De hecho, algunos de sus miembros, incluidos el citomegalovirus (CMV), el virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2) y el virus varicela-zoster (VVZ), se han relacionado con la aterosclerosis subclínica en las PVVIH en estudios transversales (22–25).

Se ha sugerido que el VVZ podría estar asociado a un mayor riesgo de enfermedad arterial periférica (26) y de síndrome coronario agudo (27). Se ha descrito también una mayor prevalencia aterosclerosis subclínica estimada mediante GIMC, que se ha asociado a la presencia de inmunoglobulina G del VVZ y a las concentraciones de marcadores inflamatorios en un estudio transversal en PVVIH (28). Lo cierto es que hasta la fecha, solo el CMV, a través de la inducción de células T específicas del CMV, ha demostrado en estudios longitudinales estar asociado con la progresión de la aterosclerosis en las PVVIH (24). Otras coinfecciones como el virus de la hepatitis C (VHC) podrían estar también asociadas con un incremento del riesgo de aterosclerosis pero la influencia sobre el GIMC es controvertida (29).

Por último, también se ha planteado que la coinfección con virus herpes humano 8 (VHH-8) podría estar involucrada en la aterogénesis (30) sobre todo en los pacientes infectados por VIH (22); esto podría deberse a la capacidad de las células endoteliales vasculares infectadas con VHH-8 para inducir la expresión de factores de crecimiento que causan la angiogénesis, la proliferación de células endoteliales, el incremento de la permeabilidad vascular y la producción de citoquinas (31).

Los datos que estarían a favor de esta hipótesis provendrían de un análisis retrospectivo de informes post mortem que describen una mayor frecuencia de lesiones ateromatosas macroscópicas en pacientes con sarcoma de Kaposi (SK) (32).

Más recientemente también se ha relacionado la coinfección con VHH-8 con un aumento de la inflamación y la activación inmune en las PVVIH suprimidas virológicamente, hecho que podría acelerar la aterosclerosis (22).

### 1.5. El virus herpes humano 8

En el año 1981 se comenzaron a detectar en Los Ángeles y Nueva York casos de SK altamente diseminado y el análisis de los tejidos reveló un nuevo virus que se identificó en 1994 y al que se llamó *virus herpes humano asociado al sarcoma de Kaposi* (VHSK), ahora conocido como el VHH-8 (31,33). El VHH-8 pertenece a la familia *herpesviridae* y a la subfamilia *gammaherpesviridae* a la que también pertenece el virus de Epstein-Barr (VEB). Es el único miembro de género *rhadinovirus* que se sabe que infecta a los humanos (31).

Desde su descubrimiento inicial, el VHH-8 ha sido sometido a una intensa investigación y la infección que provoca se ha relacionado con la patogenia diversas enfermedades, tanto neoplásicas como no neoplásicas. Hoy se sabe que el VHH-8 es un patógeno de transmisión sexual altamente prevalente entre hombres que tienen sexo con hombres (HSH) (31,33) aunque también se han descrito rutas de transmisión adicionales por saliva, infección durante la infancia y por transfusión sanguínea (34,35).

Se caracteriza por ser un herpesvirus linfotrópico y vasculotrópico. Es el agente etiológico infeccioso del linfoma primario de cavidades (PEL), la enfermedad de Castleman en su variante multicéntrica (ECM), además de estar asociado a todas las formas de SK (Tabla 1) (31,33).

Se ha especulado que puede existir una asociación entre la infección por VHH-8 y diversos trastornos inflamatorios tales como sarcoidosis, lupus eritematoso sistémico, pénfigo y linfadenopatía de Kikuchi, así como con el mieloma múltiple y síndromes de aplasia medular (31). En el caso de los pacientes infectados por VIH se ha planteado también el vínculo con la hipertensión pulmonar (36).

**Tabla 1:** *Algunas enfermedades relacionadas con los gammaherpesvirus: virus herpes humano 8 y virus de Epstein-Barr (31)*

Patologías	VHH-8	VEB
SK	+	-
ECM	+	-
PEL	+	+
PEL extracavitario	+	+
Trastorno linfoproliferativo germinotrópico	+	+
Linfoma de célula grande a partir de VHH-8 asociado a ECM	+	-

ECM, Enfermedad de Castleman multicéntrica; PEL, linfoma primario de cavidades; SK, sarcoma de Kaposi; VEB, virus de Epstein-Barr; VHH-8, virus herpes humano 8.

### 1.5.1. Prevalencia de infección por el virus herpes humano 8

En cuanto a la seroprevalencia de la infección por VHH-8 puede variar de manera amplia según varios factores, como la distribución geográfica, edad y grupos conductuales.

La mayoría de los estudios realizados han documentado una mayor prevalencia en PVVIH pero la infección por VHH-8 también ocurre en personas seronegativas para el VIH, sobre todo en los que tienen algún otro tipo de deficiencia inmunitaria, ya sea un tratamiento inmunosupresor o bien la inmunosenescencia relacionada con la edad (31). En América del Norte y Europa la prevalencia ha oscilado entre entre el 1% a y el 25 % dependiendo de las características de la población estudiada; en la mayoría de los estudios realizados en la población general está por debajo del 4% y es más elevada en los HSH. Por otro lado, en África subsahariana se han descrito prevalencias de hasta el 80 % (31,37). En la población general, la seroprevalencia por VHH-8 tiende a aumentar a lo largo de la vida a partir de los 30 años de edad y suele ser más alta en HSH, trabajadores del sexo, y usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP). (31,33).

Se ha demostrado una correlación entre una mayor seroprevalencia del VHH-8 y un mayor riesgo de SK entre HSH (37).

Con el objetivo de estimar la prevalencia media en los diferentes subgrupos, se han realizado revisiones sistemáticas en las que se sintetizan los datos de diferentes estudios de seroprevalencia del VHH-8 tanto a nivel global, dependiendo del sexo y en HSH. (Tabla 2) (33,37,38).

**Tabla 2:** Metaanálisis que han estudiado la prevalencia del virus herpes humano 8

Factores de riesgo	Población general (37)	HSH (33)	Hombres (no HSH) VS mujer (38)
<b>OR (IC 95 %)</b>			
HSH	3,95 (2,92-5,35)		
Hemofilia	3,11 (1,19-8,11)		
Infancia	2,45 (1,58-3,81)		0.90 (0.72-1.13)
Mujeres embarazadas	1,68 (1,15-2,47)		
UDVP	1,66 (1,28-2,14)	1,44 (0,06-32,47)	
Conducta sexual alto riesgo	1,66 (1,28-2,14)	1,5 (1,17-1,92)	
Conducta sexual bajo riesgo	1,42 (1,27-2,17)		
VIH	1,99 (1,70-2,34)	3,7 (2,93-4,67)	
Enfermedad de transmisión sexual		2,32 (1,82-2,97)	
Parejas sexuales múltiples		1,62 (0,95-2,72)	
Raza negra (estudio fuera de África)		1.44, (0.94-2.12)	
África subsahariana			1.21 (1.09-1.34)
Hombres no africanos			0.94 (0.83-1.06)

HSH, hombres que tienen sexo con hombres; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana; UDVP, usuarios de drogas por vía parenteral.

### *1.5.1.1. El virus herpes humano 8 en la población general incluyendo PVVIH y VIH negativos*

Rohner et al. (37) publicaron en 2016 un metaanálisis para intentar determinar la seroprevalencia por infección VHH-8 en la población general. Para ello se estudiaron diferencias en poblaciones tanto de sujetos VIH positivos como negativos, realizando una revisión de la literatura hasta 2012. Se incluyeron finalmente 93 estudios con 58,357 participantes de 32 países en África subsahariana, América del Norte y del Sur, Europa, Asia y Australia. Las conclusiones del estudio fueron que en general las PVVIH tenían más probabilidad de ser seropositivas para el VHH-8 que los VIH negativos en todos los grupos analizados (OR 1,99, IC 95% 1.70-2.34), aunque reconocieron una heterogeneidad considerable entre los estudios (I2 84%). La seropositividad del VHH-8 que fue mayor en los siguientes grupos: HSH (OR 3.95, IC 95% 2.92-5.35), pacientes con hemofilia (OR 3.11, IC 95% 1.19-8.11) y niños (OR 2.45, IC 95% 1.58 -3.81). La asociación fue también positiva pero más débil en adultos heterosexuales con conductas sexuales de bajo riesgo (OR 1.42, IC 95% 1.16-1.74), de alto riesgo (OR 1.66, IC del 95% 1.27-2.17), UDVP (OR 1.66, IC del 95%: 1,28 a 2,14); y mujeres embarazadas (OR 1,68, IC del 95%: 1,15 a 2,47).

### *1.5.1.2. El virus herpes humano 8 en los hombres que tienen sexo con hombres*

En el estudio de Liu et al. de 2016 (33) se realizó un metaanálisis que recogió 54 estudios internacionales sobre las características epidemiológicas del VHH-8 entre los HSH publicados entre 1995 y 2012. Los autores estimaron una seroprevalencia combinada del VHH-8 en HSH del 33% (IC del 95%: 29,2% -37,1%).

Los factores que se asociaron de manera significativa a la infección por VHH-8 fueron: la infección por VIH (OR 3.70, IC 95% 2.93-4.67), el diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual (OR 2.32, IC 95% 1.82-2.97), los comportamientos sexuales de alto riesgo (OR 1.50, IC 95% 1.17-1.92) y, con una significación menor para la raza negra de países no africanos (OR 1.44, IC 95% 0.94-2.12) y las parejas sexuales múltiples (OR

1.61, IC 95% 0.95-2.72. No se encontró asociación significativa entre UDVP y VHH-8 (OR 1.44, IC 95% 0.06-32.47).

Los autores destacaron que, desde el punto de vista geográfico, las poblaciones de HSH que mostraron una alta seroprevalencia fueron las de países latinoamericanos, y también las del sur de Europa en comparación con otros países europeos. No se encontraron datos en HSH de países de la África subsahariana, pese a la alta prevalencia de VHH-8 y de SK en dichos países, de forma que las estimaciones en personas de raza negra fueron derivadas de estudios realizados en países no africanos. Los autores atribuyeron esta falta de datos a la ilegalidad de las relaciones sexuales entre hombres en la mayoría de estos países. Las principales conclusiones del estudio fueron la alta prevalencia del VHH-8 entre los HSH y que los comportamientos sexuales de alto riesgo pueden facilitar la transmisión del virus, siendo por tanto una situación de especial relevancia para la salud pública sobre todo en el contexto de coinfección con el VIH.

Los HSH pueden ser, por tanto, un grupo clave que debe recibir una atención específica a la hora de vigilar la infección por VHH-8.

#### *1.5.1.3. El virus herpes humano 8 en el hombre respecto a la mujer*

Begré et al. (38) realizaron una revisión sistemática para examinar la asociación entre la seropositividad HHV-8 y el género (hombre o mujer) en la población general. Se incluyeron 22 estudios, con 36,175 participantes publicados de 1994 a 2015. Se excluyeron los estudios en poblaciones seleccionadas como donantes de sangre, personas con VIH, hospitalizados, HSH, trasplante de órgano sólido.

Los hombres del África subsahariana (OR 1.21, IC del 95%, CI 1.09-1.34), pero no los hombres de otros lugares (OR 0.94, IC 95% 0.83-1.06), tenían más probabilidades de ser seropositivos para VHH-8 que las mujeres. No se hallaron diferencias en la seroprevalencia de HHV-8 entre niños y niñas africanas (OR 0.90, IC 95% 0.72-1.13). Una mayor seroprevalencia de HHV-8 en hombres que en mujeres en África subsahariana

puede explicar parcialmente por qué los hombres tienen un mayor riesgo de SK en esta región.

Al igual que en el estudio de Liu et al. (33) los autores señalaron que únicamente dos estudios procedentes del África subsahariana informaron de la proporción de HSH y que, probablemente debido al estigma asociado a la homosexualidad, los datos sobre la orientación sexual pueden no ser suficientemente fiables, no pudiéndose excluir que los HSH puedan haber contribuido a una mayor seroprevalencia de HHV-8 en hombres en comparación con las mujeres en el África subsahariana.

### 1.5.2. Patogenia del virus herpes humano 8

Se ha aislado material genético del virus en diferentes proporciones tanto en muestras de saliva y epitelio orofaríngeo, como en semen y sangre (31,39). El VHH-8 necesita contacto directo para transmitirse, la infección primaria ocurre probablemente a través de la saliva entre personas que tienen un contacto estrecho (39,40). La transmisión por saliva parece ser un mecanismo importante a nivel general y en el África subsahariana (40), donde se ha descrito transmisión primaria entre madre e hijo y entre hermanos (31,37,41) y que podría ser, en parte, debido a la premasticación de la comida (42). En poblaciones como los HSH la seropositividad para el VHH-8 se ha relacionado con los patrones de conducta sexual incluyendo el número de parejas (37) y se han descrito mecanismos de transmisión como el contacto orogenital, oroanal, o el uso de saliva como método de lubricación (42). Se ha descrito también la transmisión por vía hemática y en transplantados pero parece ser poco frecuente a pesar de aislarse material vírico en componentes hemáticos y células endoteliales (31,37,39,41).

En la infección por VHH-8 se producen fases de latencia intracelular y fases de lisis celular propiciadas por proteínas que se codifican en su ADN. Las células B, las células endoteliales y las epiteliales pueden funcionar como reservorios naturales en la fase de latencia (31,40). Tras infectar a la célula el VHH-8 entra en fase de latencia, con una expresión de sus genes muy limitada, entre ellos LANA-1 (antígeno nuclear de

latencia 1) y vFLIP (proteína viral inhibitoria FLICE) que ayudarán a evitar la apoptosis celular, por el contrario en la fase de lisis celular se activan todos los genes del virus (40). En el caso del SK, la mayoría de las células contienen material vírico en fase de latencia y es en la fase de lisis celular cuando los viriones se desligarán de la superficie de la mucosa. Para que se produzca esta reactivación será necesaria la presencia de interferón gamma (31).

Aunque la infectividad del VHH-8 es muy baja puede incrementarse si se produce coinfección con VIH y/o VEB, este hecho se explica porque se ha descrito que únicamente la presencia de coinfección por VHH-8 puede no ser suficiente para causar la el SK y, además, en PVVIH se ha observado una mayor replicación de viriones del VHH-8 al mismo tiempo que se observaba una disminución progresiva en el número de células T (31).

Se ha propuesto que el propio VHH-8 podría contribuir a fomentar un ambiente inflamatorio del cual podría beneficiarse. Varias observaciones clínicas y evidencias histológicas y experimentales sugieren que la reactivación del VHH-8 va acompañada de procesos inflamatorios y que estos pueden favorecer su acción patógena (39,43). Un ejemplo de esto podría ser la aparición de lesiones compatibles con SK tiempo después de iniciar un TAR como parte de un síndrome de reconstitución inmune o como consecuencia del fenómeno de Koebner tras un daño tisular, quirúrgico o traumático en PVVIH sugiriendo que la inflamación o reparación de la herida puede favorecer el desarrollo del VHH-8 (39,43). Se ha descrito también, que los pacientes con infección por el VIH tienen un mayor riesgo de presentar SK que los pacientes transplantados, que también se encontrarían en un estado de inmunosupresión, lo que podría indicar que la inflamación crónica que se observa frecuentemente en pacientes con VIH podría ser un factor contribuyente (43).

En las biopsias de las lesiones del SK se observan habitualmente infiltrados inflamatorios celulares formados por monocitos, eosinófilos y células plasmáticas (39,43). Además, cuando se infectan cultivos de células endoteliales con VHH-8 se produce expresión de citoquinas inflamatorias, angiogénicas como IL6, IL8, IL1R, IL16,

interferón I2 (IL28A), IL15, y por otro lado, se sabe que el VHH-8 codifica un homólogo de IL6 (denominada interleucina viral 6, vIL6) y homólogos de las tres quimioquinas virales vCCL (ligando de quimioquina CC viral) 1, 2 y 3 (39,43). Asimismo, se ha documentado una correlación significativa entre las concentraciones de la carga viral del VHH-8 en los linfocitos B de sangre periférica y en los monocitos, y los niveles de IL-6 e interferón producidos por las células TH1 (39,43). Curiosamente, la IL-6 producida por las células TH1 es un factor de crecimiento de células B, cuyo aumento ha sido asociado a engrosamiento del GIMC y a mortalidad cardiovascular en pacientes con VIH (44).

Como ya se ha mencionado, el VHH-8 produce vIL-6, un homólogo de la IL-6, cuya expresión se ha detectado en algunas células infectadas en lesiones de SK. Se cree que la vIL-6 estimula la diferenciación de células B a células plasmáticas, pudiendo estar involucrada en la patogénesis de las enfermedades linfoproliferativas relacionadas con el VHH-8 (31,39,43). Además, vIL-6 produce diferenciación linfática en las células endoteliales vasculares que están infectadas, probablemente a través de la activación de STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3), lo cual se ha observado en el PEL, en el que se produce proliferación celular continua y en la ECM, donde la sobreproducción de vIL-6 en suero se ha relacionado con muchos síntomas sistémicos y la hipergammaglobulinemia (31,39).

En los procesos inflamatorios estimulados por el VHH-8 también se ha implicado al mediador de inflamación celular ciclooxigenasa 2 (COX-2). El incremento de COX-2 está promovido por las proteínas virales vFLIP y K15, entre otras. Se ha descrito también la sobreexpresión de COX-2 en muestras de tejido de SK y células endoteliales infectadas por el VHH-8. En las células endoteliales al incrementarse la expresión de COX-2, se favorece la secreción de quimioquinas que modifican la migración de leucocitos y el tráfico de factores proangiogénicos como VEGF. El aumento de COX-2 también propicia la activación del VHH-8 en células endoteliales y aumenta su invasividad (31,39,43).

### 1.5.3. Diagnóstico de laboratorio del virus herpes humano 8

Las pruebas serológicas que se emplean habitualmente son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la inmunofluorescencia indirecta (IFA) y el Western blot, que detectan la expresión de las proteínas de la cápside del VHH-8, orf65 y orfK8.1. La sensibilidad de estas técnicas varía según el estudio y se ha señalado su dependencia de la expresión del VHH-8 según la fase del ciclo viral en que se encuentre (31). Los autores de un estudio con PVVIH y con SK propusieron combinar la detección de proteínas propias de la fase de lisis y latencia tras alcanzar una sensibilidad de hasta un 93% (45). La especificidad de las técnicas serológicas puede afectarse por fenómenos de reactividad cruzada producidos principalmente por los anticuerpos para el VEB, los cuáles reaccionan con la proteína producida por el gen Orf25 (31).

Para detectar y confirmar la infección VHH-8 directamente sobre el tejido afectado (p.ej. para diagnóstico de SK y de los linfomas relacionados con VHH-8, pueden usarse la inmunohistoquímica o bien técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las técnicas basadas en PCR para detectar ADN de VHH-8 en sangre periférica, aunque son muy específicas, tienen como limitación que, sobre todo en la fase latente viral, pueden tener sensibilidades menores al 50%, por lo que su precisión diagnóstica es inferior a la de la serología (31).



## 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La activación inmune crónica y la inflamación son importantes factores implicados en la patogénesis de la aterosclerosis. A pesar del TAR eficaz, existe inflamación residual persistente en PVVIH, y la infección con co-patógenos es uno de los mecanismos que podrían contribuir a ello. Los herpesvirus son altamente prevalentes entre las PVVIH. Esta familia de virus ha estado particularmente implicada en la patogénesis de la aterosclerosis. Algunos de sus miembros, incluidos el CMV, el VHS-2 y el VVZ, se han relacionado con la aterosclerosis subclínica en las PVVIH, principalmente en estudios transversales. Entre ellos, el VHH-8 es un candidato interesante como posible implicado en la patogénesis de la aterosclerosis en las PVVIH ya que VHH-8 es un virus prevalente entre HSH, especialmente en aquellos infectados por VIH. Es un virus linfotrópico y vasculotrópico vinculado con el SK, y posiblemente con hipertensión pulmonar en PVVIH. Debido a la capacidad de las células endoteliales vasculares infectadas por VHH-8 para inducir la expresión de factores de crecimiento que causan angiogénesis, proliferación de células endoteliales, aumento de permeabilidad vascular y producción de citoquinas, se ha sugerido que el VHH-8 podría estar involucrado en la aterogénesis, pero los datos son muy limitados. Además, la coinfección por VHH-8 se ha asociado con una mayor inflamación y activación inmune en PVVIH suprimidas virológicamente. La infección por este virus podría asociarse a una mayor progresión de la arteriosclerosis subclínica medida por el GIMC.



### 3. HIPÓTESIS

La coinfección por virus del grupo herpesvirus, como el VHH-8, en PVVIH podría contribuir a la progresión de la arteriosclerosis.





## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Explorar la relación de la coinfección por el VHH-8 con la progresión de la aterosclerosis subclínica mediante la evaluación longitudinal del GIMC en una cohorte de PVVIH suprimidas virológicamente.

### 4.2. Objetivos específicos

- 1) Evaluar las diferencias en la progresión de la aterosclerosis medida por GIMC en PVVIH coinfectadas y no coinfectadas por el VHH-8.
- 2) Analizar la relación de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales con la progresión del GIMC.
- 3) Analizar la relación de la inflamación medida por el biomarcador sérico “proteína C reactiva” ultrasensible con la progresión del GIMC.
- 4) Estudiar la relación de los factores inmuno-virológicos asociados a la infección por VIH con la progresión del GIMC.
- 5) Estimar la progresión de la aterosclerosis a través del GIMC en un período de 8 años en PVVIH virológicamente suprimidas.



## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Diseño del estudio

Estudio longitudinal en una cohorte de base hospitalaria que se ha desarrollado durante un periodo de 8 años.

### 5.2. Población del estudio

El estudio se realizó en la cohorte de PVVIH adultas atendidas en las consultas externas de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario de Elche (HGUE), perteneciente al Departamento de Salud de Elche – Hospital General. El Hospital da cobertura asistencial a todo el departamento sanitario que engloba los municipios de Elche y Santa Pola con una población global de 163.576 habitantes.

Todos los pacientes fueron HSH que estaban infectados por VIH. Todos los pacientes con estas características que se encontraban en seguimiento en las consultas externas eran candidatos a ser incluidos en el estudio debido a su mayor riesgo de infección por VHH-8, por lo que les invitó de manera consecutiva a participar en la investigación a medida que eran atendidos, y se les realizaron mediciones ecográficas periódicas del GIMC.

Los pacientes que se perdieron durante el seguimiento y únicamente pudieron realizarse una determinación del GIMC no fueron incluidos finalmente en el estudio para el que era indispensable disponer de, al menos, dos mediciones ecográficas. Se excluyeron también los participantes que tenían antecedentes de enfermedad coronaria.

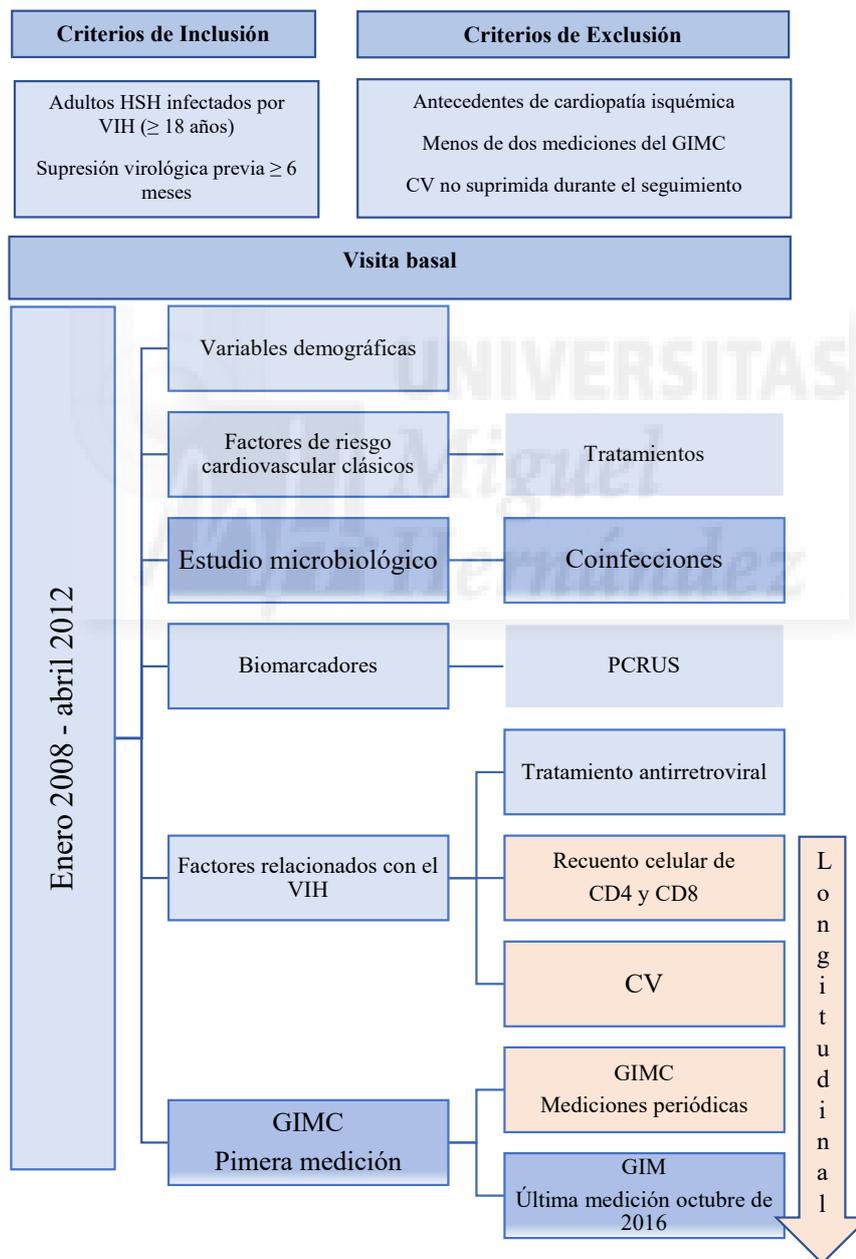
Para evitar el efecto de confusión que pudiera tener la replicación del VIH, solo se analizaron los participantes cuya medición del GIMC coincidía con un estado de supresión virológica. Esta supresión fue definida como una carga viral  $<200$  copias / ml. Se excluyeron 9 participantes con niveles detectables de ARN del VIH en alguna de las mediciones.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética local (Comité Ético del Hospital General Universitario de Elche) y todos los sujetos incluidos firmaron un consentimiento informado.

### 5.3. Registro de los datos

Las variables demográficas, clínicas y de laboratorio se recopilaron en la visita basal, que tuvo lugar entre enero de 2008 y abril de 2012. La última medición de la GIMC se realizó en octubre de 2016 (Figura 2, Tabla 01 y 02).

**Figura 2:** *Recolección de los datos y fases del estudio*



CV, carga viral del VIH; GIMC, grosor íntima-media carotídeo, HSH, hombres que tienen sexo con hombres; PCRUS, proteína C ultrasensible; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana.

#### 5.4. El grosor íntima-media carotídeo

La variable dependiente o principal del estudio es la progresión del GIMC (Tabla 3). Para poder evaluar la progresión de la aterosclerosis subclínica, se realizaron mediciones sucesivas del GIMC de la arteria carótida común y bulbo carotídeo con ecografía de alta resolución en modo B. La medición ecográfica se realizó utilizando un protocolo estandarizado que ya se ha descrito previamente (46). Se tomaron tres medidas de las porciones derecha e izquierda de carótida común y el bulbo en la pared más alejada del ecógrafo (Figura 3).

**Tabla 3:** Variables dependientes en el estudio

Tasa de progresión del GIMC bulbar (mm/año)
Aparición de nuevas placas
Aparición de nuevos eventos vasculares

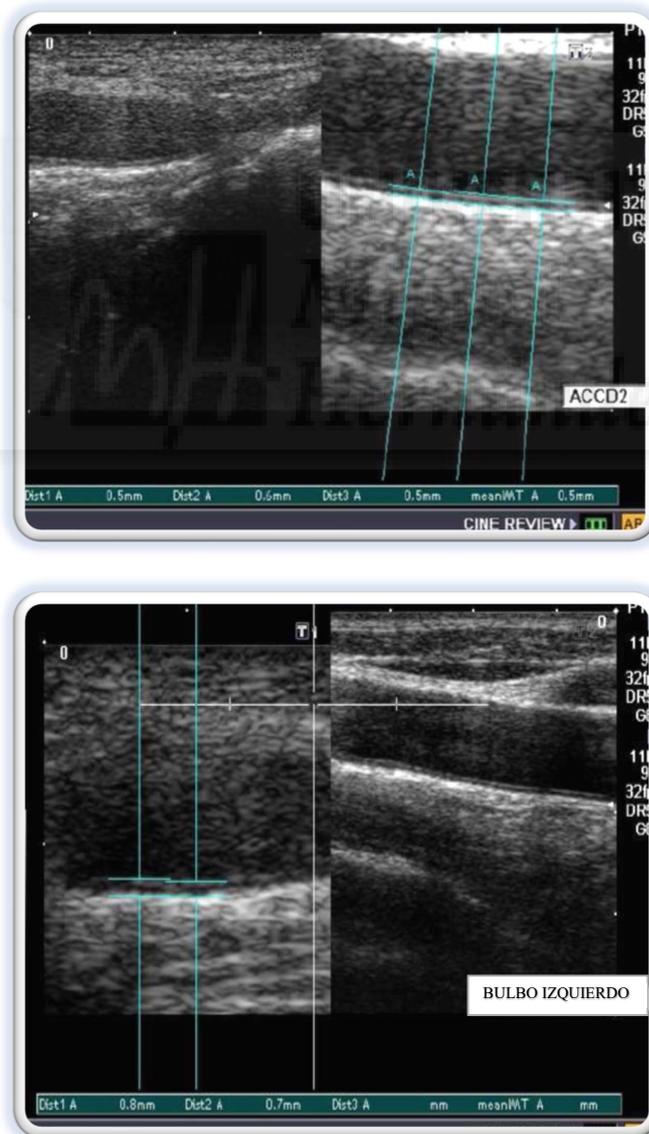
El GIMC total en las carótidas comunes derecha e izquierda y en los bulbos se calculó con la media de todas las mediciones y se analizó como una variable continua. Se eligieron los bulbos carotídeos para evaluar la progresión de la GIMC debido a las tasas de progresión más elevadas descritas en esta ubicación en las PVVIH (14).

La placa carotídea se definió como una medida GIMC que resultara superior a 1,5 mm. Para minimizar la variabilidad, todas las mediciones fueron realizadas por el mismo operador de forma enmascarada, desconociendo los detalles clínicos del paciente y de las exploraciones anteriores, en el momento de la realización de las pruebas. Las mediciones de GIMC se realizaron con una frecuencia aproximadamente anual/bianual.

Para evaluar si los pacientes del estudio desarrollaban nuevas placas durante el seguimiento, calculamos una nueva variable que definimos como empeoramiento o incremento de la placa. Esta variable tomó el valor 1 cuando se produjo un cambio respecto a su situación basal, es decir, se produjo la aparición de una nueva medida del

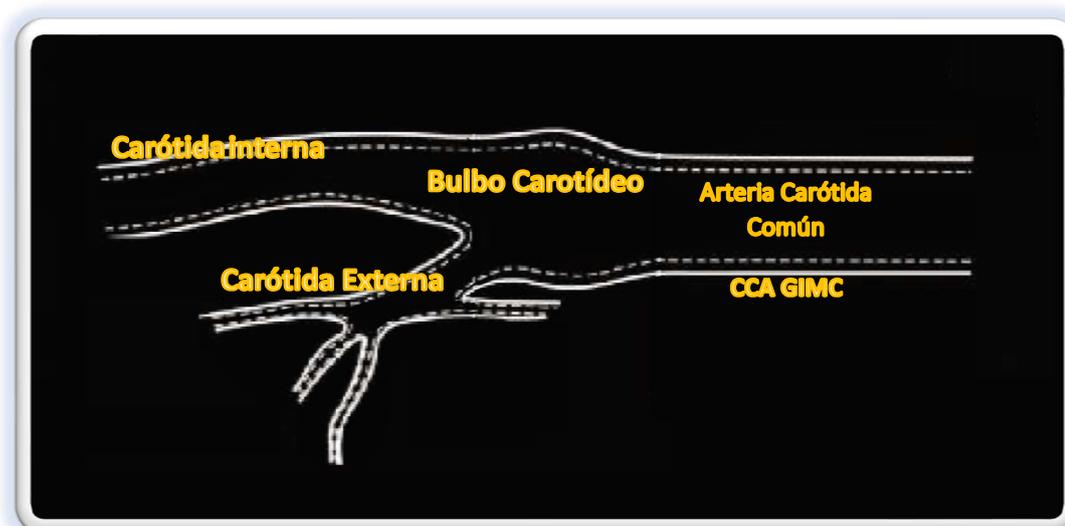
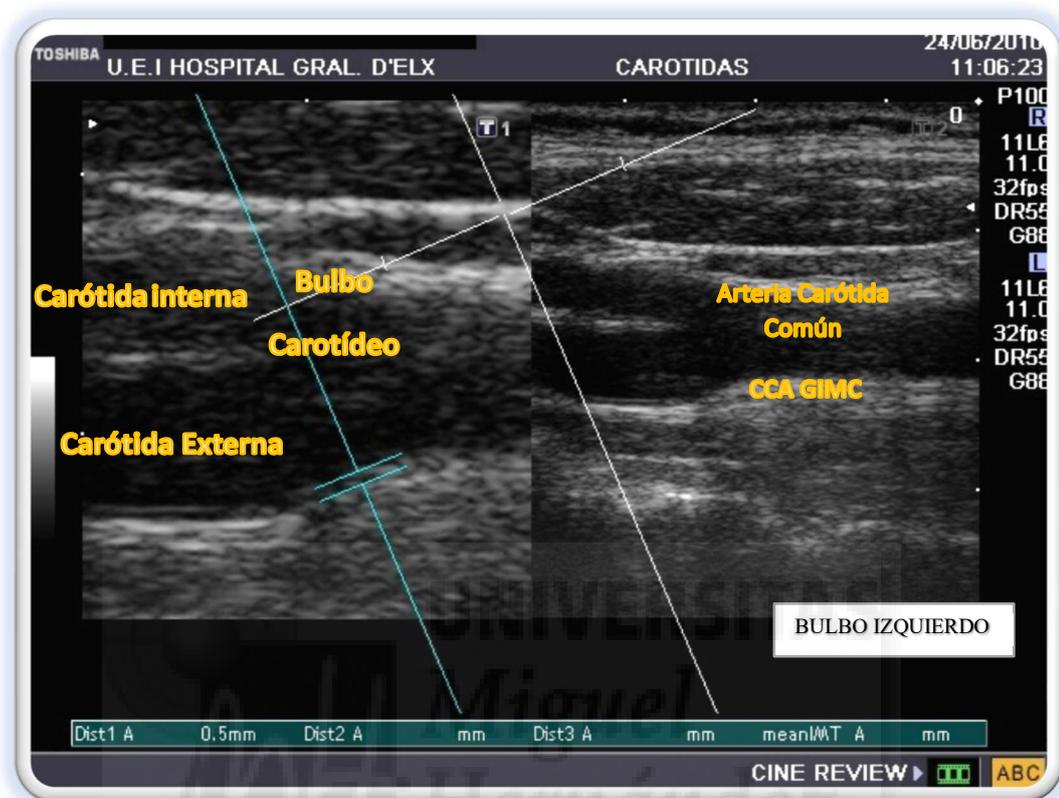
GIMC > 1,5 mm en un paciente sin placa previa o en una nueva localización si ya tenía una placa previamente. Si el paciente se mantenía sin cambios respecto al estado basal, es decir, no desarrollaba ninguna nueva placa, independientemente del estado basal, el valor de la variable se mantendría como 0. Por tanto, podrían darse situaciones como las siguientes: a) el paciente pasa de cero a una placa, o de una a dos (valor 1); b) el paciente se mantiene sin placas durante el estudio o mantiene su placa inicial sin incrementar el número de las mismas (valor 0).

**Figura 3:** Medida del grosor intima-media carotídeo en arteria carótida común derecha (arriba) y bulbo izquierdo (abajo)



ACCD, arteria carótida común derecha.

**Figura 4:** Medida del grosor íntima-media carotídeo en bulbo carotídeo izquierdo. Esquema adaptado de Zócalo, Y (47)



CCA, arteria carótida común; GIMC, grosor íntima-media carotídeo.

### 5.5. Los factores de riesgo cardiovascular clásicos

La hipertensión (HTA), la diabetes mellitus 2 y la dislipidemia se definieron por un diagnóstico previo o por una prescripción actual de terapia farmacológica correspondiente para cualquiera de estos factores de riesgo (Tabla 4).

Los factores de riesgo cardiovascular se manejaron en las consultas de acuerdo con un protocolo estándar: Las cifras objetivo de la tensión arterial fueron <140 mmHg para la presión sistólica y <90 mmHg para la presión arterial diastólica. Para los pacientes con diabetes o enfermedad renal, los objetivos fueron <130/80 mmHg. Para lograr los objetivos de la tensión arterial, se implementó un protocolo predefinido, comenzando con modificaciones en el estilo de vida y agregando secuencialmente los siguientes medicamentos en cada visita: (i) un bloqueador del receptor de angiotensina; (ii) un diurético tiazídico; y (iii) un bloqueador de canales de calcio o un bloqueador  $\beta$ .

En pacientes con diabetes mellitus 2 confirmada, el objetivo era reducir el nivel de hemoglobina A1c a <7%. Para lograr este objetivo, se aplicó un protocolo predefinido a partir de metformina.

Para el manejo de los lípidos, el objetivo terapéutico para el colesterol LDL fue <130 mg / dL, iniciando fármacos hipolipemiantes (estatinas) después del fracaso de la terapia dietética.

En pacientes con triglicéridos muy altos ( $\geq 500$  mg / dL), la primera prioridad fue la reducción de triglicéridos con dieta y fenofibrato en primera instancia o bien con estatinas y/o ezetimiba si no se lograba dicho objetivo. Se recomendó la pérdida de peso y / o ejercicio y a los fumadores el cese del hábito tabáquico.

**Tabla 4:** Variables independientes o predictoras (I): demográficas y factores de riesgo cardiovascular Clásicos

Variables demográficas		
Edad, años,		Variable cuantitativa continua
Factores de riesgo cardiovascular clásicos		
Hipertensión arterial	Diagnóstico con TA > 140/90 mmHg	Variable cualitativa categórica
Tratamiento hipotensor	IECAs, ARAII; betabloqueantes, calcioantagonistas	Variable cualitativa categórica
Dislipemia	Colesterol total o triglicéridos > 200 mg./dl, LDL > 120 mg/dL o HDL < 40 mg./d	Variable cualitativa categórica
Tratamiento hipolipemiente	Uso de estatinas, fibratos. Todos los pacientes han sido diagnosticados de dislipemia	Variable cualitativa categórica
Diabetes mellitus 2	Glucosa en sangre $\geq 200$ mg/dl incidental, > 120 en ayunas o Hemoglobina glicosilada A1C $\geq 6.5\%$ .	Variable cualitativa categórica
Hábito tabáquico	Fumador activo Si/No	Variable cualitativa categórica
Exfumadores	Abandono del hábito tabáquico	Variable cualitativa categórica
Escala de riesgo de Framingham, %,	% de riesgo futuro de padecer episodios de enfermedad coronaria (EC) en los siguientes 10 años	Variable cuantitativa continua
PCRUS	Proteína C ultrasensible medida en mg/mL	Variable cuantitativa continua
Variables ecográficas		
Placa	GIMC > 1.5 mm	Variable cualitativa categórica
Media del GIMC	Se realizarán 3 medidas tanto para la carótida común, interna y bulbo de lado izquierdo y derecho. Se realizará la media aritmética entre las mediciones en cada lugar anatómico, posteriormente entre izquierda y derecha	Variable cuantitativa continua

ARAI, antagonista del receptor de angiotensina II; GIMC, grosor íntima-media carotídeo; HDL, *high density lipoprotein*; IECA, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; LDL, *low density lipoprotein*; PCRUS, proteína C reactiva ultrasensible; TA, tensión arterial.

## 5.6. Estudio microbiológico y biomarcadores

En la visita inicial, se extrajo a los pacientes una muestra de sangre que se empleó para las pruebas de rutina, los estudios serológicos y la medición de biomarcadores (Tabla 5).

Los anticuerpos IgG contra la mayoría de los herpesvirus se midieron mediante kits de prueba ELISA comerciales: FOCUS Diagnostics (Cypress, U.S.A) para VHS-2; Vircell SL (España) para el VVZ y Siemens Healthcare Diagnostics (España) para el CMV. La coinfección por VHH-8 se evaluó con el ensayo de fluorescencia indirecta (Advanced Biotechnologies INC, EE. UU.). Esta última prueba proporcionó una determinación cualitativa, pero no cuantitativa, de anticuerpos IgG.

La infección por VHC se definió por una serología positiva más un ARN del VHC positivo por reacción en cadena de la polimerasa.

Los recuentos de células CD4 + y CD8 +, y el ARN del VIH se midieron al inicio del estudio y cada seis meses a lo largo del período de estudio.

PCRUS se midió con un ensayo inmunométrico quimioluminiscente (Immulate 2000, Siemens).

**Tabla 5:** *Variables independientes o predictoras (II): relacionadas con el VIH y sus coinfecciones*

<b>Factores relacionados con el VIH</b>		
Recuento celular CD4, células/ microL		<i>Variable cuantitativa continua</i>
Recuento celular CD8, células/ microL		<i>Variable cuantitativa continua</i>
Carga viral, copias/ml		<i>Variable cuantitativa continua</i>
Duración de la supresión virológica, años		<i>Variable cualitativa categórica</i>
Tratamiento con IP		<i>Variable cualitativa categórica</i>
Tratamiento con ITINAN		<i>Variable cualitativa categórica</i>
Tratamiento con INSTI		<i>Variable cualitativa categórica</i>
<b>Coinfecciones</b>		
VHH-8 seropositivo	Anticuerpo IgG positivo	<i>Variable cualitativa categórica</i>
CMV seropositivo	Anticuerpo IgG positivo	<i>Variable cualitativa categórica</i>
VHS-2 seropositivo	Anticuerpo IgG positivo	<i>Variable cualitativa categórica</i>
VVZ seropositivo	Anticuerpo IgG positivo	<i>Variable cualitativa categórica</i>
Coinfección con VHC	Anticuerpos + ARN positivos	<i>Variable cualitativa categórica</i>

ARN, ácido ribonucleico; CMV, citomegalovirus; IgG, inmunoglobulina G; INSTI, Inhibidores de la integrasa; IP, inhibidores de la proteasa; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos; VHC, virus de la hepatitis C; VHH-8, virus herpes humano 8; VHS-2, Herpes simple tipo 2; VVZ, Virus varicela-zóster.

## 5.7. Análisis estadístico

### 5.7.1. Factores asociados con la coinfección por virus herpes humano 8

Para los análisis estadísticos se utilizaron el programa SPSS y R. Las diferencias en las características demográficas y clínicas entre los pacientes con y sin coinfección por VHH-8 se evaluaron mediante chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas, y las pruebas T de Student o U de Mann-Whitney para las variables continuas. Posteriormente, las variables en las que se observó una asociación estadísticamente significativa con la infección por el VHH-8 en el análisis univariante, se analizaron con un modelo de regresión logística con variable de respuesta binaria, en concreto se usó un modelo lineal general binomial mixto con función de enlace complementario log-log.

### 5.7.2. La progresión del grosor-íntima carotídeo

Para evaluar la progresión del GIMC se examinó en cada paciente de manera individual la evolución del GIMC respecto a las mediciones previas tanto en el bulbo izquierdo como en el derecho. Se seleccionaron todos los incrementos positivos del GIMC. Para analizar los factores asociados a la progresión del GIMC se construyó un modelo lineal general mixto, tomando como efecto aleatorio al paciente como individuo. Inicialmente se realizaron modelos estadísticos univariantes y una vez completados, las variables que se asociaron de manera significativa a la progresión del GIMC se seleccionaron para elaborar los modelos estadísticos multivariantes.

Para realizar el ajuste de los modelos univariantes se incluyeron las variables relativas a las coinfecciones con virus herpes, los valores de las células CD4 contemporáneos a las medición del GIMC y la composición del régimen antirretroviral debido a su asociación con enfermedad cardiovascular en PVVIH (23,25,28,48). En cuanto al recuento celular de CD4 que se incluyeron en los análisis, se seleccionaron los recuentos que estuvieran lo más cerca posible de la fecha de medición del GIMC poniendo como fecha límite un intervalo de seis meses previos o posteriores. Con el

objetivo de evitar un sobreajuste en el modelo, se seleccionó la puntuación de riesgo en la escala de Framingham como una variable resumen que recogiera todos los factores de riesgo cardiovascular individuales para su inclusión en los modelos para predecir la progresión del GIMC.

Cuando se produjo alguna pérdida en los datos, la ausencia de los mismos se manejó a través del análisis de datos completos o *listwise deletion*. La significación estadística para estos modelos se definió por un valor de P bilateral o de dos colas  $<0.05$ .

### 5.7.3. Aparición de nuevas placas y eventos cardiovasculares

Las asociaciones entre la coinfección por VHH-8 y el riesgo de nuevas placas en desarrollo y eventos cardiovasculares se examinaron mediante modelos lineales generalizados utilizando como variable de exposición u *offset* el tiempo hasta el desarrollo del evento o hasta el final del período de observación del estudio. Las variables incluidas en los análisis fueron el riesgo cardiovascular al inicio del estudio, evaluado por la puntuación de riesgo de Framingham, la PCRUS, los factores relacionados con el VIH, el tipo de tratamiento antirretroviral y la coinfección con herpesvirus.

### 5.7.4. Potencia del estudio.

Con el tamaño de la muestra de nuestro estudio, teniendo en cuenta un error alfa de 0,05 y un “tamaño del efecto d” de 0,5 tenemos una potencia del estudio  $(1-\beta)$  de 0,88. Con un tamaño del efecto d de 0,2 la potencia del estudio  $(1-\beta)$  sería de 0,3.



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Características basales y clínicas de los pacientes del estudio

Los datos **clínicos** iniciales se muestran en la [Tabla 6](#). El estudio incluyó a 141 participantes que se reclutaron de manera consecutiva y que estaban recibiendo TAR, permaneciendo así su carga viral suprimida (ARN del VIH <200 copias / ml) durante al menos 6 meses antes del estudio y en las mediciones de GIMC que se realizaron durante el período de estudio. La edad media ( $\pm$  desviación estándar, SD) de los pacientes del estudio fue de 46 ( $\pm$  13) años. En cuanto a los datos **analíticos** y **virológicos** la mediana (Q1-Q3) del recuento de células CD4 fue de 608,5 (391,8-847,5) células /  $\mu$ L y del recuento de células CD8 fue de 690,5 (690,25 – 1446,25) células /  $\mu$ L. La mediana (Q1-Q3) del tiempo de supresión virológica fue 4,66 (2,70-6,82) años. La mediana (Q1-Q3) de la PCRUS fue de 2,16 (1,03-4,55) mg/mL.

Los regímenes **antirretrovirales** más frecuentes se basaron en inhibidores de la proteasa (IP) (38% de los participantes) y en inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINAN) (31%), y con menor frecuencia inhibidores de la integrasa (INSTI) (26%).

En cuanto a las **coinfecciones**, las más frecuentes fueron VVZ con el 96% y CMV con el 91%, seguidos de VHS-2 con el 54%. Las coinfecciones menos frecuentes fueron VHH-8 con el 30,5% y por último VHC con el 10% ([Tabla 6](#) y [Figura 5](#)).

Respecto a los **factores de riesgo cardiovascular** del total de pacientes del estudio, el 44 % tenían el diagnóstico de dislipemia, el 30% eran diabéticos, el 51 % eran fumadores y el 30% tenían hipertensión arterial. La mediana (Q1-Q3) de la puntuación de la escala de riesgo de Framingham fue del 7 % (2-3).

Respecto a los parámetros **ecográficos**, se realizó una mediana (Q1-Q3) de 4 (2-3) mediciones del GIMC, la mediana (Q1-Q3) del GIMC basal al inicio del estudio fue de 0,89 (0,73-1,19) mm, la mediana (Q1-Q3) del tiempo que pasó entre mediciones del

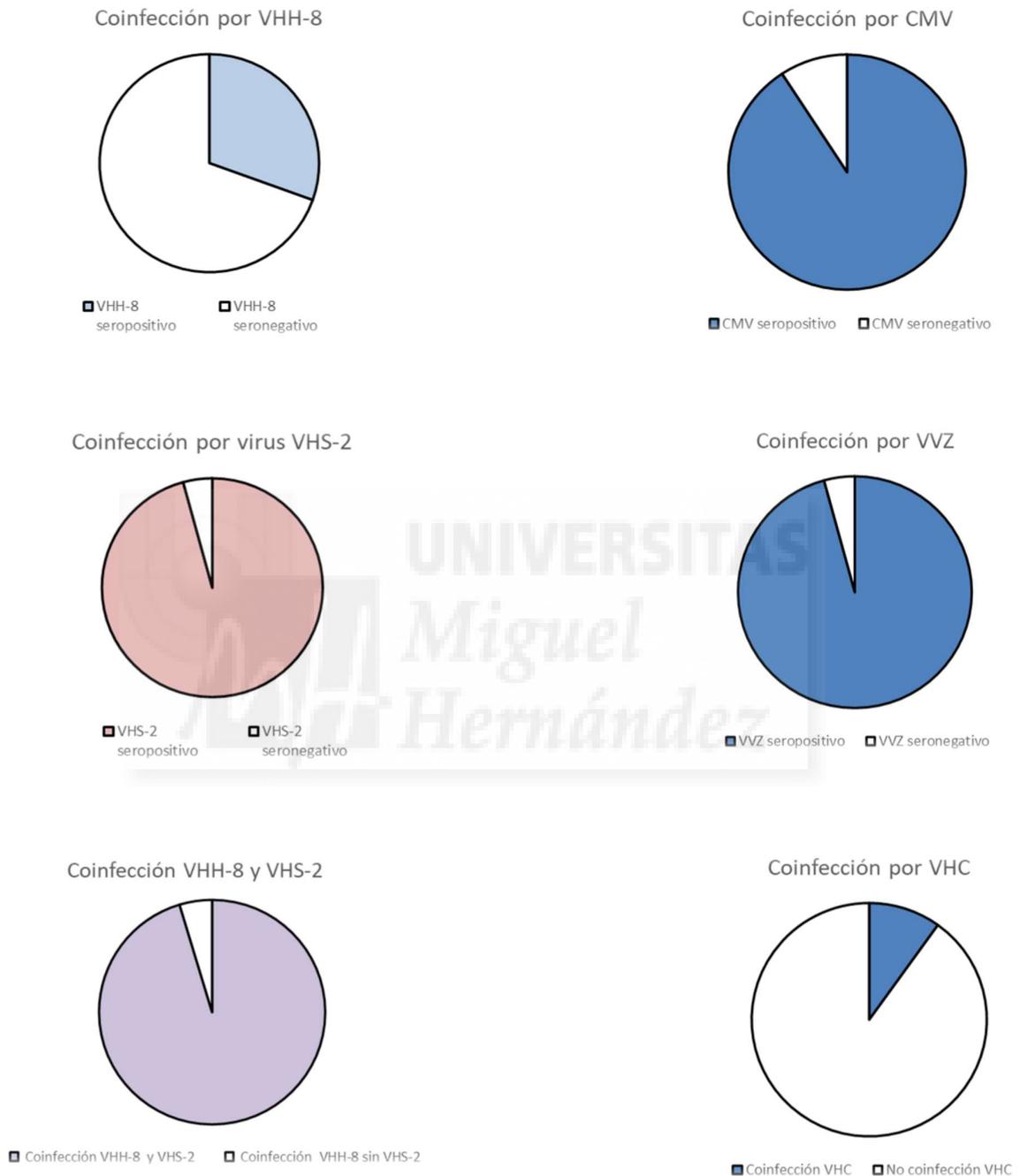
GIMC fue de 1,67 (1,08 – 2,85) años y el número de pacientes con presencia de una placa al inicio del estudio fue de 40 (28%).

**Tabla 6:** *Características basales de los pacientes con virus herpes humano 8*

Variable	Todos los pacientes	VHH-8 seropositivo N=43	VHH-8 seronegativo N=98	P-valor
Edad, años, media (SD)	46 (13)	49,31(14,74)	44,95 (12,50)	0,090
CD4 recuento celular, cél/ $\mu$ L	608,50 (391,75-847,50)	605 (383 - 803)	608 (424,50-854,75)	0,675
CD8 recuento celular, cél/ $\mu$ L	989,50 (690,25-1446,25)	866 (619,50-1144)	1024,50 (713,50-1574,50)	0,053
Tratamiento con IP	54 (38)	15 (35)	39 (40)	0,707
Tratamiento con ITINAN	53(31)	20(47)	33 (34)	0,186
Tratamiento con INSTI	36 (26)	10 (23)	26 (27)	0,834
Tratamiento hipotensor	29 (21)	8(19)	21 (21)	0,822
Hipertensión arterial	42(30)	14 (33)	28 (29)	0,691
Dislipemia	62 (44)	23 (53)	39 (40)	0,144
Tratamiento hipolipemiente	43 (30)	13 (30)	30 (31)	>0,999
Diabetes mellitus 2	43(30)	1 (10)	42 (31)	0,097
Hábito tabáquico	72 (51)	24 (56)	48 (49)	0,471
Exfumadores	19 (14)	5 (12)	14 (14)	0,792
Escala de Riesgo de Framingham, %, mediana (Q1-Q3)	7 (2-3)	9 (4,25-15)	6 (2-12)	0,053
Coinfección con VHC	14 (10)	1 (2)	13 (13)	0,064
VHS-2 seropositivo	76 (54)	34 (79)	42 (46)	<0,001
VVZ seropositivo	135 (96)	41 (95)	94 (96)	>0,999
CMV seropositivo	128 (91)	41 (95)	87 (89)	0,105
PCRUS, mg/mL	2,16 (1,03 - 4,55)	3,77 (1,34-7,31)	1,89 (0,91-3,94)	0,003
GIMC Basal, mm	0,89 (0,73-1,19)	1 (0,75-1,29)	0,83 (0,70-1,10)	0,054
Placas carotídeas	40 (28)	14 (33)	26 (27)	0,544
Tiempo entre mediciones, años	1,67 (1,08 - 2,85)	1,60 (1,04- 2,75)	1,70 (1,10- 2,92)	0,430
Duración de la supresión virológica, años	4,66 (2,70-6,82)	4,027 (2,61-6,82)	4,791(3,92-6,48)	0,135

Las variables continuas están expresadas como mediana (Q1-Q3), si no se indica otra cosa. Las variables categóricas se expresan como porcentaje (%). CMV, citomegalovirus; GIMC, grosor íntima-media carotídeo; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos; INSTI, inhibidores de la integrasa; IP, inhibidores de la proteasa; SD, desviación estándar; PCRUS, proteína C reactiva ultrasensible; VHH-8, virus herpes humano 8; VHS-2, herpes simple tipo 2; VVZ, virus varicela-zóster.

**Figura 5:** Coinfecciones dentro del total de pacientes del estudio



En la columna de la izquierda las coinfecciones por: VHH-8; virus herpes humano 8, VHS-2, virus herpes simple 2. En la columna de la derecha las coinfecciones por: CMV, citomegalovirus; VVZ, virus varicelazóster; VHC, virus hepatitis C.

## 6.2. Características basales y clínicas de los infectados por virus herpes humano 8

Los datos **clínicos** de los pacientes infectados por el VHH-8 se muestran en la [Tabla 6](#). El estudio incluyó a 43 pacientes infectados por el VHH-8, cuya edad media ( $\pm$  desviación estándar, SD) fue de 49,31 ( $\pm$  14,74) años y de 44,95 ( $\pm$  12,50) años en los VHH-8 negativos,  $p = 0,675$ .

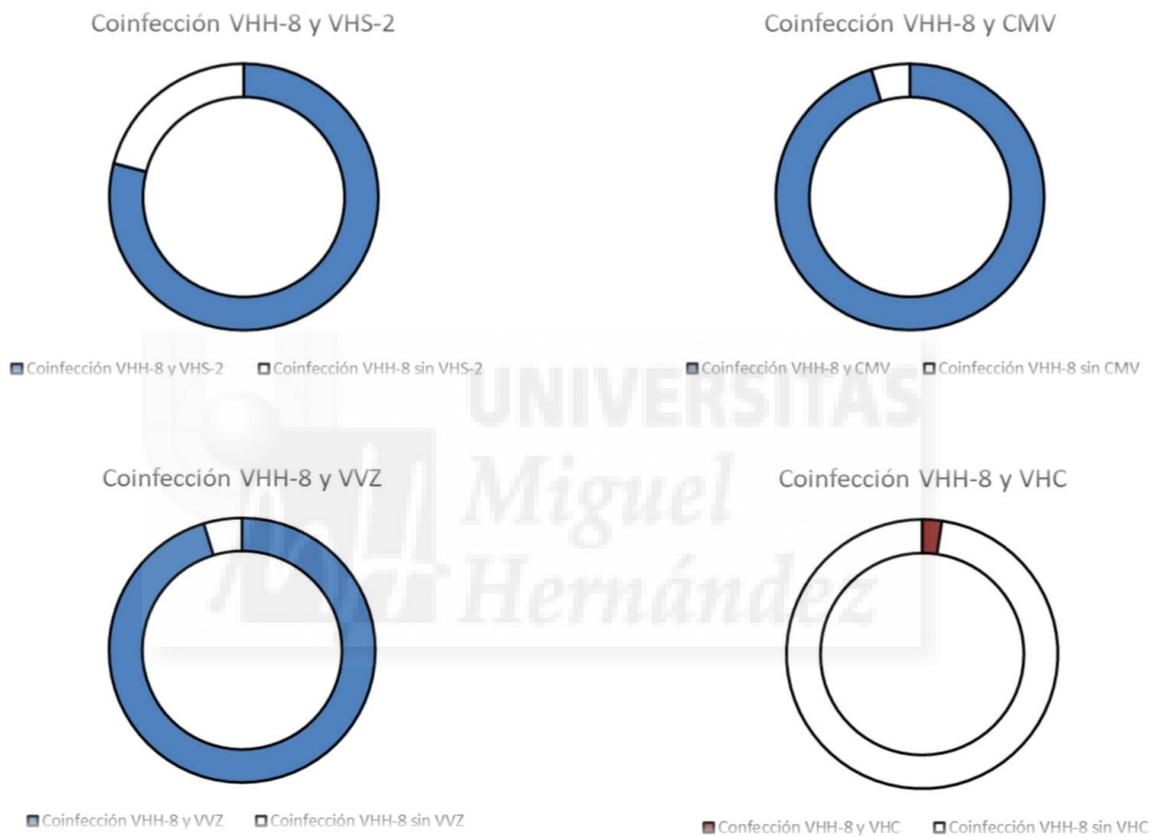
Revisando los parámetros **analíticos** y **virológicos** la mediana (Q1-Q3) del recuento de células CD4 fue de 605,5 (383-803) células /  $\mu$ L en los pacientes con VHH-8 positivos versus 608 (424,5-854,75) células /  $\mu$ L en los VHH-8 negativos seronegativos,  $p=0,675$ . La mediana (Q1-Q3) del recuento de células CD8 fue menor en los pacientes VHH-8 positivos con 866 (619,5-1144) células /  $\mu$ L versus 1224,5 (713,5-1574,5) células /  $\mu$ L en los VHH-8 negativos,  $p=0,053$ . La mediana (Q1-Q3) del tiempo de supresión virológica fue similar en ambos grupos, en los VHH-8 positivos fue 4,027 (2,61-6,82) años versus los 4,791 (3,92 – 6,48) años de los VHH-8 negativos,  $p=0,135$ . Donde sí se observaron diferencias fue en la mediana (Q1-Q3) de la PCRUS en los pacientes VHH-8 positivos, que fue mayor con 3,77 (1,34-7,31) mg/dL versus 1,89 (0,91-3,94) mg/dL en los no coinfectados,  $p= 0,003$ . En la [Figura 7](#) puede verse reflejada gráficamente esta relación.

Los regímenes **antirretrovirales** más frecuentes tanto en VHH-8 seropositivos como seronegativos fueron los basados en ITINAN con un 47% versus el 34%,  $p=0,086$ , y los IP en un 35% versus el 40 %,  $p=0,707$ . Con menor frecuencia que los anteriores se usaron los inhibidores de la integrasa con un 23% versus 27%  $p=0,834$ .

Las **coinfecciones** con otros virus ([Tabla 6](#) y [Figura 6](#)) que resultaron más frecuentes, y de manera similar en VHH-8 seropositivos y seronegativos fueron el VVZ (94% versus el 96%,  $p>0,999$ ) y el CMV (94% versus el 96 %,  $p= 0,105$ ). Menos frecuente resultó la coinfección con VHS-2 que se observó en mayor medida en pacientes VHH-8 seropositivos que en los seronegativos: 79% frente a 46%,  $p<0,001$ . La coinfección menos frecuente en ambos grupos fue el VHC y esto resultó más evidente

en los VHH-8 seropositivos donde se observó una frecuencia menor que en los pacientes VHH-8 seronegativos: 2% frente a 13%,  $p=0,064$ .

**Figura 6:** Coinfecciones entre el virus herpes humano 8 con el virus de la hepatitis C, el virus varicela-zóster y el citomegalovirus



CMV, citomegalovirus, VHC, virus de la hepatitis C; VHH-8, virus herpes humano 8, VVZ, virus varicela-zóster.

Respecto a los **factores de riesgo cardiovascular**, la mediana (Q1-Q3) de la puntuación de la escala de riesgo de Framingham fue mayor en los pacientes VHH-8 seropositivos con 9% (4,25-15) versus 6% (2-12) en los seronegativos,  $p=0,053$ . El diagnóstico de diabetes mellitus 2 tendió a ser menos frecuente en pacientes VHH-8 seropositivos que en seronegativos: 10% versus 31%,  $p=0,097$ .

Los factores de riesgo vascular que se observaron con mayor frecuencia y de manera similar en ambos grupos fueron el hábito tabáquico y el diagnóstico de dislipemia. El tabaquismo se observó en el 56% de los VHH-8 seropositivos y en el 49% en los seronegativos,  $p=0,471$ . La dislipemia tuvo una frecuencia en VHH-8 seropositivos del 53% versus al 40% en los seronegativos  $p=0,144$ . En ambos grupos, aproximadamente un tercio de los pacientes recibió tratamiento hipolipemiante, siendo la frecuencia en los VHH-8 seropositivos de un 30% versus el 31% en VHH-8 seronegativos,  $p>0,999$ . El diagnóstico de hipertensión arterial se observó también en aproximadamente un tercio de los pacientes y de manera similar en ambos grupos: 33% en los VHH-8 seropositivos vs 28% en VHH-8 negativos,  $p=0,691$ . En ambos grupos un porcentaje parecido de pacientes recibieron tratamiento hipotensor o antihipertensivo, con un 19% en los VHH-8 seropositivos y un 21% en los seronegativos,  $p=0,822$  (Tabla 6).

Respecto a los parámetros **ecográficos** observados en ambos grupos, la mediana (Q1-Q3) del GIMC basal en los pacientes VHH-8 tendió a ser mayor con un 1 (0,75-1,29) mm versus 0,83 (0,70-1,10) mm en VHH-8 seronegativos,  $p=0,054$  (Tabla 6). La mediana (Q1-Q3) del tiempo que pasó entre mediciones del GIMC de 1,60 (1,04-2,75) años versus 1,70 (1,10-2,92),  $p=0,430$ . No se observaron diferencias en la mediana (Q1-Q3) del tiempo que pasó entre mediciones del GIMC en ambos grupos: 1,60 (1,04-2,75) versus 1,70 (1,10-2,92) años,  $p=0,430$ . No hubo diferencia en la proporción de pacientes con placas carótideas al inicio del estudio entre los pacientes VHH-8 seropositivos y seronegativos: 33% versus 27% respectivamente,  $p=0,544$ .

Se exploró la **asociación entre el VHH-8 y la PCRUS** mediante un modelo lineal general binomial mixto con enlace *clog-log* (Tabla 7). Se incluyeron en el análisis los factores en los que se había encontrado asociación con la infección por VHH-8 en el modelo univariante (Tabla 6) con el objetivo de valorar su interacción conjunta. Los factores que se eligieron para ajustar el modelo fueron la puntuación de riesgo de Framingham, la coinfección con VHC, el recuento celular de CD8, la PCRUS y el GIMC basal. Los resultados mostraron que los individuos coinfectados con VHH-8 continuaron teniendo niveles significativamente más altos de PCRUS en el modelo ajustado (OR 1,09

[IC 95%, 1,02-1,17],  $p = 0,016$ . No hubo diferencias significativas en el GIMC basal después del ajuste entre los participantes infectados por VHH-8 y los no infectados.

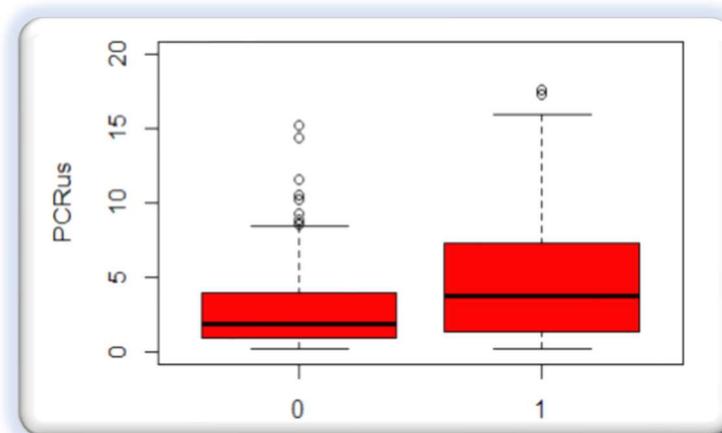
**Tabla 7:** Modelo lineal general binomial mixto con enlace clog-log que muestra los factores asociados con infección por el virus herpes humano 8

Variable	OR (IC 95%)	p-valor
PCRUS, mg/mL	1,09 (1,02 - 1,17)	<b>0,017</b>
Escala de riesgo de Framingham	1,0 (0,95 - 1,05)	0,901
Coinfección con VHC	0,26 (0,01-1,25)	0,188
Recuento celular CD8, cél/ $\mu$ L	1,0 (1,0- 1,0)	0,132
GIMC basal, mm	1,42 (0,70 - 2,68)	0,316

GIMC, grosor íntima-media carotídeo; PCRUS, proteína C reactiva ultrasensible; VHC, virus de la hepatitis C.

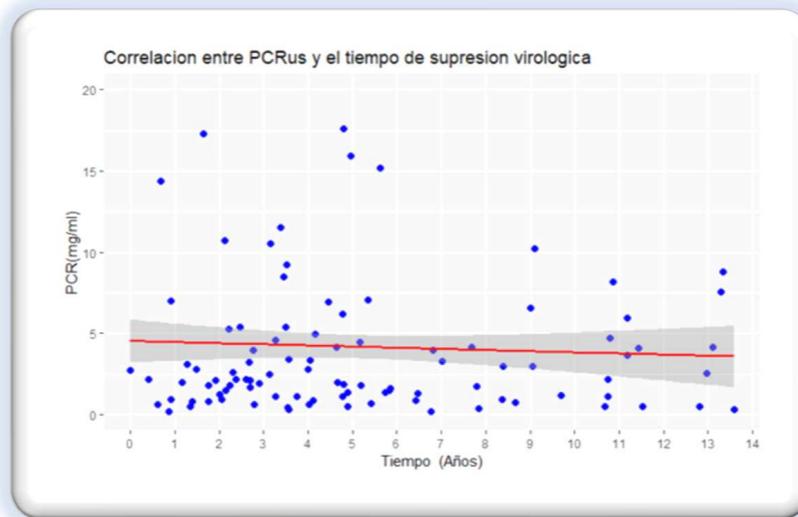
También se exploró la relación de la PCRUS con la duración de la supresión virológica mediante una correlación de Pearson. Hubo una tendencia hacia una PCR más baja en pacientes con una supresión más prolongada, pero la correlación no fue estadísticamente significativa (correlación de Pearson - 0,078;  $p=0,34$ ) (Figura 8).

**Figura 7:** Proteína C ultrasensible en los pacientes con infección por el virus herpes humano 8 (seropositivo =1, seronegativo =0)



PCRUS, proteína C reactiva ultrasensible.

**Figura 8:** Proteína C ultrasensible según el tiempo de supresión virológica



PCRUS, proteína C reactiva ultrasensible.

### 6.3. Factores asociados a la progresión del grosor íntima-media carotídeo

El tiempo medio de seguimiento (Q1-Q3) por paciente fue de 5,07 (4,38-6,03) años. Todos los pacientes se sometieron al menos a dos, y 108 (76%) a tres o más exámenes de GIMC. Hubo una tendencia a un GIMC basal más alto en los pacientes VHH-8 seropositivos que en los seronegativos con una mediana (Q1-Q3) de 1 (0,75-1,29) versus 0,83 (0,70-1,10),  $p=0,054$  (Tabla 6). La tasa general de progresión del GIMC en el bulbo fue de +0,027 mm/año: 0,031 en VHH-8 coinfectados y 0,024 en VHH-8 no infectados ( $p=0,872$ ). En la Figura 10 y en la Figura 11 se muestra la mediana de la progresión del bulbo carotídeo según el orden de la medición del GIMC y la edad respectivamente.

Los factores asociados con la progresión de la GIMC en el análisis univariante se evaluaron mediante un modelo lineal general mixto (Tabla 8). Los resultados mostraron que la positividad para la infección por VHH-8 ( $p=0,046$ ), para la infección por VHS-2 (0,049), la dislipidemia ( $p=0,024$ ), el tratamiento hipolipemiante ( $p=0,015$ ), la hipertensión ( $p=0,035$ ), el tratamiento con los fármacos antihipertensivos ( $p=0,026$ ), la puntuación de riesgo de Framingham ( $p=0,005$ ), los niveles más altos de PCRUS ( $p=0,025$ ) y la presencia de una placa carotídea ( $p<0,001$ ) se asociaron con una mayor progresión del GIMC.

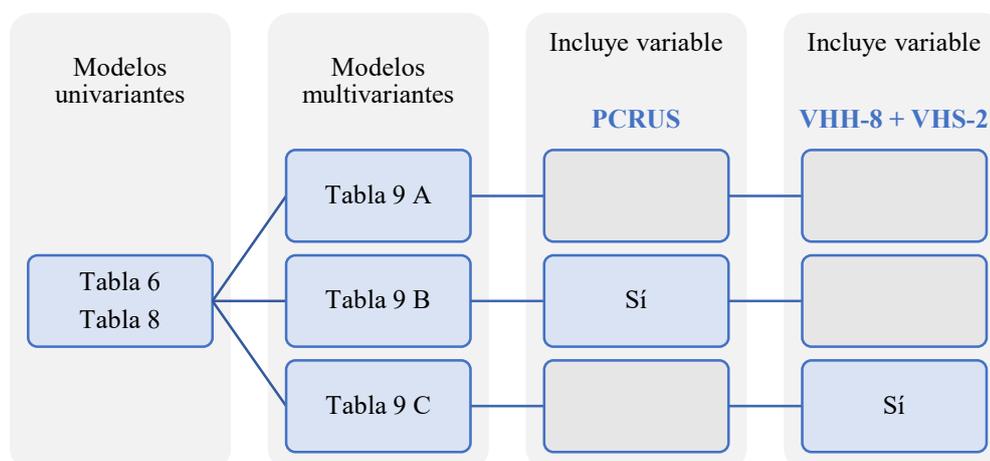
Se ajustó un modelo multivariante para evaluar los factores independientes asociados con progresión del GIMC, que incluía seropositividad para VHH-8, VHS-2, CMV y VVZ, recuentos de células CD4 en la medición de GIMC, edad, puntuación de riesgo de Framingham como variable de resumen que incluye todos los factores de riesgo cardiovascular, coinfección por VHC, tipo de tratamiento antirretroviral y tiempo transcurrido entre las mediciones GIMC (Figura 9, Tabla 9 A, Tabla 9 B, Tabla 9 C).

El modelo mostró que la puntuación de riesgo de Framingham ( $p = 0,057$ ) y la coinfección con VHH-8 ( $p = 0,059$ ), tendieron a tener una asociación significativa con una mayor progresión del GIMC (Tabla 9 A).

Se construyó otro modelo similar al previo, esta vez añadiendo PCRUS. El modelo mostró que la PCRUS ( $p = 0,031$ ) se asoció con una mayor progresión de la GIMC, pero la relación con la seropositividad del VHH-8 se atenuó mucho ( $p = 0,182$ ) (Tabla 9 B).

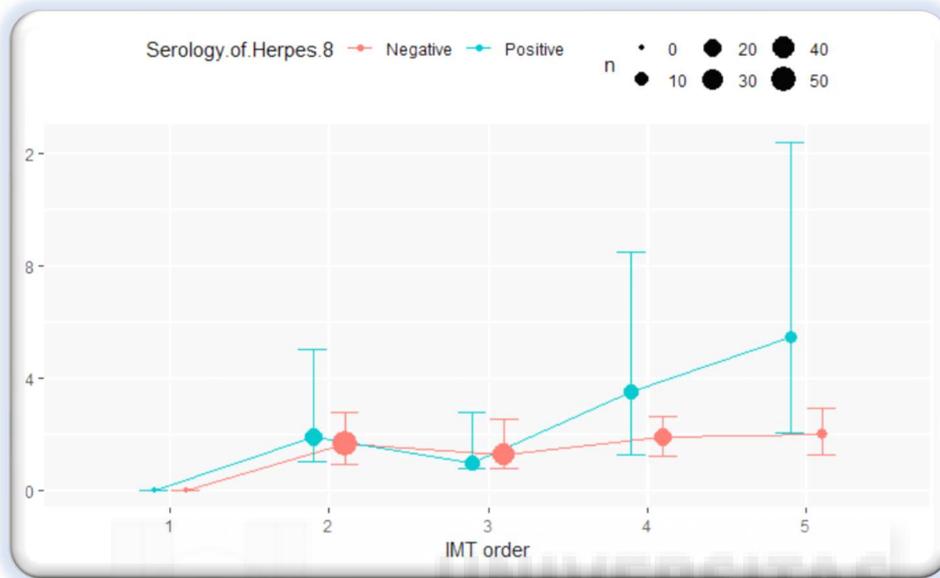
Debido a la asociación que se encontró previamente de VHH-8 y VHS-2 con la progresión del GIMC en el análisis univariante, se desarrolló un tercer modelo con la particularidad de añadir una variable conjunta, siendo esta la “coinfección con VHH-8 + VHS-2”. El modelo que incluyó la variable conjunta mostró que la seropositividad de VHH-8 + VHS-2 ( $p = 0,028$ ) y la puntuación de riesgo de Framingham ( $p = 0,025$ ) se asociaron significativamente a una mayor progresión del GIMC (Tabla 9 C).

**Figura 9:** Resumen de los modelos que incluyen virus herpes humano 8 y herpes simple tipo 2: Factores asociados a la progresión del grosor íntima-media carotídeo



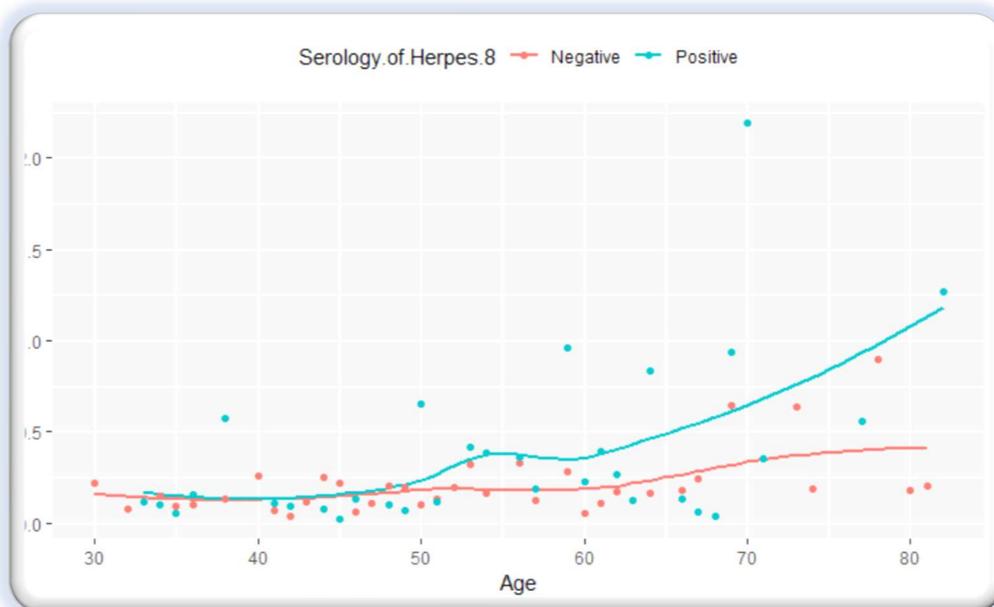
PCRUS, proteína C reactiva ultrasensible; VHH-8, virus herpes humano 8; VHS-2, virus herpes simple 2.

**Figura 10:** Mediana (Q1-Q3) de la progresión del bulbo según el orden de medición del grosor íntima-media carotídea en los pacientes con infección del virus herpes humano 8



El tamaño de círculo en cada medición indica el número de pacientes (n) de esa determinación (de 1 a 5). IMT, *intima-media thickness* o grosor íntima-media carotídeo

**Figura 11:** Mediana de la progresión del bulbo según la edad en los pacientes con infección por virus herpes humano 8 representado con un suavizado del diagrama de dispersión o smoothing



**Tabla 8:** Modelo lineal general mixto univariante que muestra factores asociados con la progresión de grosor íntima-media carotídeo en el bulbo

Variable	Coficiente	p-valor
Recuento celular CD4, cél/ $\mu$ L	0,0000163	0,850
Recuento celular CD8, cél/ $\mu$ L	0,0000193	0,639
Placa carotídea (GIMC>1,5 mm)	0,3361776	<0,001
Lipodistrofia	0,0782997	0,224
<b>Dislipemia</b>	<b>0,1743712</b>	<b>0,001</b>
Tratamiento hipolipemiante	0,1677437	0,004
<b>Hipertensión Arterial</b>	<b>0,1130260</b>	<b>0,052</b>
Tratamiento hipotensor	0,1531224	0,016
Diabetes mellitus 2	0.158	0.105
Hábito tabáquico	-0,0279689	0,616
Exfumador	-0,0130822	0,863
Alcohol	-0,0679639	0,449
<b>Escala de riesgo de Framingham, %</b>	<b>0,0131646</b>	<b>0,000</b>
<b>PCRUS, mg/mL</b>	<b>0,0086430</b>	<b>0,001</b>
<b>VHH-8 seropositivo</b>	<b>0,1526580</b>	<b>0,009</b>
<b>VHS-2 seropositivo</b>	<b>0,1103244</b>	<b>0,049</b>
VZV seropositivo	-0,0342831	0,832
CMV seropositivo	0,0388794	0,658
Coinfección con VHC	-0,0045131	0,963
<b>Tratamiento con IP</b>	<b>0,0521954</b>	<b>0,366</b>
Tratamiento con INSTI	0,0234031	0,717

CMV, citomegalovirus; GIMC, grosor íntima-media carotídeo; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos; INSTI, inhibidores de la integrasa; IP, inhibidores de la proteasa; PCRUS, proteína C reactiva ultrasensible; VHC, virus de la hepatitis C; VHH-8, virus herpes humano 8; VHS-2, herpes simple tipo 2; VVZ, virus varicela-zóster.

**Tabla 9 A:** *Modelo lineal general mixto multivariante ajustado mostrando los factores asociados a la progresión de grosor íntima-media carotídeo en el bulbo*

Variable	Coefficiente	(95% CI)	p-valor
Tiempo, años	0,0338	(-0,0089 - 0,0765)	0,118
Escala de riesgo de Framingham, %	0,0090	(-0,0003 - 0,0183)	0,057
Recuento celular CD4, cél/mm <sup>3</sup>	0,0014	(-0,0077 - 0,0106)	0,758
Edad, años	0,0045	(-0,0003 - 0,0094)	0,066
VHH-8 seropositivo	0,1252	(-0,0048 - 0,2551)	0,059
VHS-2 seropositivo	- 0,0270	(-0,1626 - 0,1086)	0,693
VZV seropositivo	- 0,0942	(-0,4309 - 0,2424)	0,579
CMV seropositivo	-0,0352	(-0,2369 - 0,1664)	0,729
Coinfección con VHC	0,0376	(-0,2061 - 0,2813)	0,760
Tratamiento con IP	0,0290	(-0,0907 - 0,1487)	0,632
Tratamiento con INSTI	0,0003	(-0,1329 - 0,1336)	0,996

CMV, citomegalovirus; GIMC, grosor íntima-media carotídeo; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos; INSTI, inhibidores de la integrasa; IP, inhibidores de la proteasa; VHC, virus de la hepatitis C; VHH-8, virus herpes humano 8; VHS-2, herpes simple tipo 2; VVZ, virus varicela-zóster.

**Tabla 9 B:** Modelo lineal general mixto multivariante ajustado mostrando los factores asociados a la progresión de Grosor íntima-media carotídeo en el bulbo

Variable	Coefficiente	(95% CI)	p-valor
Tiempo, años	0,0359	(-0,0063 - 0,0782)	0,094
Escala de riesgo de Framingham, %	0,0080	(-0,0011 - 0,0170)	0,084
Recuento celular CD4, cél/mm <sup>3</sup>	0,0010	(-0,0080 - 0,0100)	0,825
Edad, años	0,0044	(-0,0003 - 0,0091)	0,068
PCRUS, mg/mL	0,0063	(0,0007 - 0,0119)	0,027
VHH-8 seropositivo	0,0869	(-0,0437 - 0,2176)	0,189
VHS-2 seropositivo	-0,0340	(-0,1660 - 0,0890)	0,611
VZV seropositivo	-0,0719	(-0,4014 - 0,2575)	0,666
CMV seropositivo	-0,0140	(-0,2120 - 0,1840)	0,889
Coinfección con VHC	0,040	(-0,1970 - 0,2784)	0,735
Tratamiento con IP	0,0218	(-0,0950 - 0,1385)	0,712
Tratamiento con INSTI	0,0041	(-0,1256 - 0,1338)	0,950

CMV, citomegalovirus; VHC, virus de la hepatitis C; VHH-8, virus herpes humano 8; VHS-2, Herpes simple tipo 2; VZV, Virus varicela-zóster; IP, inhibidores de la proteasa; INSTI, Inhibidores de la integrasa; PCRUS, Proteína C Reactiva Ultrasensible.

**Tabla 9 C:** *Modelo lineal general mixto multivariante ajustado mostrando los factores asociados a la progresión de grosor íntima-media carotídeo en el bulbo*

Variable	Coefficiente	(95% CI)	p-valor
Tiempo, años	0,0297	(-0,0122 - 0,0720)	0,166
Escala de riesgo de Framingham, %	0,0097	(0,0007 - 0,0187)	0,035
Recuento celular CD4, células/mm <sup>3</sup>	0,0010	(-0,0080 - 0,0100)	0,826
Edad, años	0,0048	(0,0001 - 0,0096)	0,046
VHH-8 seropositivo	-0,1156	(-0,3616 - 0,1304)	0,354
VHS-2 seropositivo	-0,1151	(-0,2680 - 0,0379)	0,139
VHS-2 + VHH-8 seropositivo	0,3230	(0,0330 - 0,6076)	0,027
VZV seropositivo	-0,0552	(-0,3851 - 0,2747)	0,741
CMV seropositivo	-0,0436	(-0,2408 - 0,1535)	0,661
Coinfección con VHC	-0,0034	(-0,2429 - 0,2362)	0,978
Tratamiento con IP	0,0122	(-0,1049 - 0,1294)	0,836
Tratamiento con INSTI	0,0395	(-0,0940 - 0,1729)	0,559

CMV, citomegalovirus; GIMC, grosor íntima-media carotídeo; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos; INSTI, inhibidores de la integrasa; IP, inhibidores de la proteasa; VHC, virus de la hepatitis C; VHH-8, virus herpes humano 8; VHS-2, herpes simple tipo 2; VVZ, virus varicela-zóster.

#### **6.4. Características basales de los pacientes en los que se observó incremento del número de placas**

Los datos clínicos de los 38 (27%) pacientes en los que se observó incremento en el número de placas inicial se muestran en la [Tabla 10](#). Catorce (36,8%) ya tenían placa al inicio del estudio. La mediana (Q1-Q3) de edad fue de 55,89 (47,78-66,08) años y la mediana (Q1-Q3) del recuento de células CD4 fue de 570 (460-799,75) células /  $\mu$ L. La mediana (Q1-Q3) del valor de la PCRUS en estos pacientes fue de 3,055 (0,815- 7,423) unidades.

Los regímenes antirretrovirales más frecuentes en los pacientes que incrementaron sus placas fueron los IP (42%), los ITINAN (34,2%) y, se usaron con menor frecuencia los INSTI (21,1%).

La frecuencia de coinfecciones fue la siguiente, las más frecuente fue CMV con el 97,94%, después VVZ con el 94,7% y VHS-2 con el 60,5%. La coinfección con menor prevalencia fueron la de VHH-8 con 13 (35,5%) y VHC, con 4 pacientes (10,5%) ([Tabla 10](#)).

En cuanto a los factores de riesgo cardiovascular tradicionales de los pacientes que incrementaron su número basal de placas, el 60,3% de ellos estaba diagnosticado de dislipemia y el 42,1 % estaba en tratamiento hipolipemiante. El 47,4 % de los pacientes eran fumadores, el 36,8 % tenían hipertensión arterial y el 17 % eran diabéticos. La mediana (Q1-Q3) de la puntuación de la escala de riesgo de Framingham fue de 10 (7-16) %.

#### **6.5. Factores asociados al incremento del número de placas respecto al inicio del estudio**

Los pacientes que vieron incrementado su número basal de placas tenían una edad más avanzada, con una mediana (Q1-Q3) de 56 (49-66) años versus 49 (42 - 59) años ( $p=0,001$ ), y una mayor puntuación en la escala de Framingham con una mediana (Q1-Q3) de 10 (7-16) % versus 5 (3-13 % ,  $p=0,001$ ).

El incremento del número de placas se asoció también a una mayor frecuencia de dislipemia con un 60,5 % versus el 38,8%,  $p=0,022$ .

**Tabla 10:** Características basales de los pacientes con incremento del número de placas

Variable	Incremento N=38	No incremento N=103	p-valor*
<b>Edad, años, mediana</b>	55,89 (47,78-66,08)	49,18 (41,99-59,18)	<b>0,001</b>
CD4 recuento celular, cél/ $\mu$ L	570 (460-799,75)	622 (429,75-841,75)	0,804
CD8 recuento celular, cél/ $\mu$ L	801,5 (468,75-1034)	850,5 (557-1161)	0,425
Carga viral, copias	0 (0-27,25)	0 (0-20)	0,305
Categoría clínica C (CDC)	9 (23,7)	32 (31,2)	0,374
Tratamiento con IP	16 (42)	38 (36,9)	0,572
Tratamiento con ITINAN	13 (34,2)	40 (38,8)	0,615
Tratamiento con INSTI	8 (21,1)	27 (26,2)	0,529
Tratamiento hipotensor	11 (28,9)	18 (17,5)	0,135
Hipertensión arterial	14 (36,8)	28 (27,2)	0,266
<b>Dislipemia</b>	<b>23 (60,5)</b>	<b>40 (38,8)</b>	<b>0,022</b>
Diabetes mellitus 2	4 (10,5)	6 (5,8)	0,335
Hábito tabáquico	18 (47,4)	53 (51,5)	0,667
<b>Escala de riesgo de Framingham, %</b>	<b>10 (7-16)</b>	<b>8 (3-13)</b>	<b>0,001</b>
Coinfección con VHC	4 (10,5)	11 (10,7)	0,979
VHH-8 seropositivo	13 (35,1)	30 (29,1)	0,497
VHS-2 seropositivo	23 (60,5)	53 (51,5)	0,137
VZV seropositivo	36 (94,7)	98 (95,1)	0,219
CMV seropositivo	37 (97,4)	91 (88,3)	0,311
PCRUS, mg/mL	3,055 (0,815- 7,423)	2,51 (1,185-4,95)	0,664
GIMC Basal, mm	1,038 (0,919-1,4)	0,9 (0,722- 1,206)	0,08 #
Presencia de Placa carotídea previa	14 (36,8)	14 (36,8)	0.131

Las variables continuas están expresadas como mediana (Q1-Q3), si no se indica lo contrario. Las variables categóricas se expresan como porcentaje (%). \* Test de Fisher para variables dicotómicas y Wilcoxon para variables continuas # 0.08 suponiendo normalidad y 0,1 no suponiendo normalidad. CDC, centros para la prevención y control de enfermedades de los Estados Unidos; CMV, citomegalovirus; GIMC, grosor íntima-media carotídeo; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos; INSTI, inhibidores de la integrasa; IP, inhibidores de la proteasa; VHC, virus de la hepatitis C; VHH-8, virus herpes humano 8; VHS-2, herpes simple tipo 2; VVZ, virus varicela-zóster.

También se emplearon modelos lineales generalizados para estudiar la asociación del incremento del número de placas con los factores de riesgo relacionados con el VIH y factores de riesgo cardiovascular tradicionales. La puntuación de riesgo de Framingham al inicio fue el único factor asociado con la aparición de nuevas placas (OR ajustado 1,126 [IC del 95%, 1,05-1,20],  $p < 0,0001$ ) (Tabla 11).

**Tabla 11:** Modelo lineal general mixto multivariante que muestra factores asociados con empeoramiento del número de placas

	OR	IC	p-valor
Escala de riesgo de Framingham, %	1,126	1,05 - 1,2	0,000
VHH-8 seropositivo	1,047	0,38 - 2,89	0,930
Recuento celular CD4, cél/ $\mu$ L	0,999	1 - 1	0,358

VHH-8, virus herpes humano 8.

## 6.6. Características de los pacientes que tuvieron eventos vasculares durante el estudio

Seis pacientes desarrollaron eventos vasculares durante el período de estudio (Tabla 12 y Tabla 16): 5 eventos coronarios y 1 enfermedad arterial periférica. Los pacientes que tuvieron eventos vasculares tendieron a ser mayores 66,31 (54,7 – 75,4) versus 48,12 (42,16 – 57,3) años ( $p = 0,050$ ), tuvieron un menor recuento de células CD4: 333 (289,75–365,75) versus 621 (431,25–864,75) ( $p = 0,012$ ) y con más frecuencia habían sido clasificados en categoría C del CDC (66,67% vs 20,74%) ( $p = 0,028$ ). Casi la totalidad de los pacientes con eventos vasculares tenían dislipemia, 5 (80,33%) ( $p = 0,051$ ) e hipertensión arterial 5 (83,33%) ( $p = 0,006$ ). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la puntuación de la escala de Framingham.

Tabla 12: Variables basales de los pacientes que tuvieron eventos vasculares durante el seguimiento

Variable	Eventos vasculares (n=6)	No eventos vasculares (n=135)	p-valor*
Edad	66,31 (54,7 – 75,4)	48,13 (42,16 – 57,3)	<b>0,050</b>
Recuento celular CD4, células/μL	333 (289,75 - 365,75)	621 (431,25 - 864,75)	<b>0,012</b>
Escala de riesgo de Framingham, %	11,5 (5,75 - 18)	7 (2 - 13)	0,246
Categoría clínica C (CDC)	4 (66,67)	28 (20,74)	<b>0,028</b>
Lipodistrofia	3 (50,0)	26 (19,26)	0,146
Diabetes mellitus 2	1 (16,67)	9 (6,67)	0,4251
Hipertensión arterial	5 (83,33)	32 (23,7)	<b>0,006</b>
Dislipemia	5 (83,33)	47 (34,81)	<b>0,051</b>
VHH-8 seropositivo	0 (0,0)	37 (27,4)	<b>0,083</b>

Las variables continuas están expresadas como mediana (Q1-Q3), si no se indica lo contrario. Las variables categóricas se expresan como porcentaje (%). \* Test de Fisher para variables dicotómicas y Wilcoxon para variables continuas. CDC, centros para la prevención y control de enfermedades de los Estados Unidos; VHH-8, virus herpes humano 8.

## 6.7. Factores asociados a la aparición de eventos vasculares durante el estudio

Para valorar qué factores de riesgo estaban asociados a la aparición de eventos vasculares durante el seguimiento hasta el año 2016 se realizó un modelo lineal general mixto donde se observó que el recuento celular de CD4 era un factor protector con una asociación estadísticamente significativa [OR 0,992 (p=0,050)] (Tabla 13).

**Tabla 13:** Modelo lineal general mixto multivariante que muestra factores asociados con los eventos vasculares producidos durante el estudio

Variable	OR	IC	p-valor
Edad	1,114	0,97 - 1,28	0,128
<b>Recuento celular CD4, células/μL</b>	<b>0,992</b>	<b>0,98 - 1</b>	<b>0,050</b>
Categoría clínica C (CDC)	7,699	0,34 - 175,52	0,201
Dislipemia	6,687	0,28 - 158,84	0,240
Hipertensión arterial	11,021	0,41 - 295,81	0,153
VHH-8 seropositivo	0,000	0 - Inf	0,996

CDC, centros para la prevención y control de enfermedades de los Estados Unidos; VHH-8, virus herpes humano 8.

## 6.8. Factores asociados a la aparición de eventos vasculares y/o incremento del número de placas

Por otro lado, también se exploraron los factores asociados con el desarrollo de eventos vasculares y/o la aparición de una nueva placa mediante un modelo lineal general mixto. En el modelo univariante (Tabla 14) se encontró una asociación estadísticamente significativa con la escala de riesgo de Framingham [OR 1,071 (p=0,016)], un mayor grosor del GIMC a nivel bulbar [OR 4,665 (p=0,002), hipertensión arterial [OR 2,621 (p=0,023)] y con el diagnóstico de dislipemia [OR 3,267 (p=0,001)].

En el modelo multivariante (Tabla 15), los resultados mostraron también una asociación estadísticamente significativa entre una mayor puntuación en la escala de riesgo de Framingham [OR 1,073 (p=0,017)] y el riesgo conjunto de tener un evento vascular y/o desarrollar una placa. No se encontró asociación entre las coinfecciones y el riesgo de eventos vasculares y/o desarrollo de placas durante el seguimiento.

**Tabla 14:** *Modelo lineal general mixto univariante que muestra factores asociados con los eventos vasculares y/o aparición de nuevas placas producidos durante el estudio*

Variables	OR	IC 95%	p-valor
<b>Escala de riesgo de Framingham, %</b>	<b>1,071</b>	<b>1,01 - 1,13</b>	<b>0,016</b>
<b>Media del GIMC bulbar</b>	<b>4,665</b>	<b>1,72 - 12,64</b>	<b>0,002</b>
Categoría clínica C (CDC)	0,741	0,32 - 1,71	0,481
Carga viral	1,011	0,99 - 1,04	0,342
Presencia de placa previa	1,874	0,81 - 4,35	0,143
<b>Diabetes mellitus 2</b>	<b>4.25</b>	<b>1.02- 28.87</b>	<b>0.074</b>
<b>Dislipemia</b>	<b>3.267</b>	<b>1.65- 6.63</b>	<b>0.001</b>
<b>Hipertensión arterial</b>	<b>2,621</b>	<b>1,14 - 6,03</b>	<b>0,023</b>
Lipodistrofia	0,731	0,3 - 1,75	0,482
CD8 recuento celular, cél/ $\mu$ L	1,000	1 - 1	0,256
CD4 recuento celular, cél/ $\mu$ L	0,999	1 - 1	0,256
PCRUS	1,011	0,97 - 1,05	0,615
VHS-2 seropositivo	1,523	0,7 - 3,32	0,289
VHH-8 seropositivo	0,807	0,35 - 1,86	0,614
Tratamiento con IP	1,158	0,53 - 2,55	0,717
Tratamiento con INSTI	0,532	0,21 - 1,32	0,175

CDC, centros para la prevención y control de enfermedades de los Estados Unidos; CMV, citomegalovirus; GIMC, grosor íntima-media carotídeo; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos; INSTI, inhibidores de la integrasa; IP, inhibidores de la proteasa; PCRUS, Proteína C Reactiva Ultrasensible; VHC, virus de la hepatitis C; VHH-8, virus herpes humano 8; VHS-2, herpes simple tipo 2; VVZ, virus varicela-zóster.

**Tabla 15:** Modelo lineal general mixto multivariante que muestra factores asociados con los eventos vasculares y/o aparición de nuevas placas producidos durante el estudio

Variable	OR	IC	p-valor
Recuento celular CD4, cél/ $\mu$ L	0,999	1-1	0,206
<b>Escala de riesgo de Framingham, %</b>	<b>1,073</b>	<b>1,01 – 1,14</b>	<b>0,017</b>
VHH-8 seropositivo	0,700	0,29 – 1,67	0,422

VHH-8, virus herpes humano 8.

## 6.9. Eventos vasculares hasta 2018

Tras el final del estudio en 2016, también se contabilizaron los eventos vasculares acaecidos hasta finales del año 2018. Se produjeron cuatro nuevos eventos, dos eventos coronarios y dos accidentes vasculares isquémicos. A finales de 2018 se habían producido por tanto 10 eventos vasculares, de los cuales tres fueron en pacientes VHH-8 seropositivos y siete seronegativos (Tabla 16).

## 6.10. Pacientes que fallecieron durante el transcurso del estudio y después de su finalización

Durante el seguimiento (hasta 2016), un total de cuatro pacientes del estudio fueron éxitus (Tabla 17). Dos de ellos por infección respiratoria grave y otros dos pacientes por causa no determinada tras búsqueda exhaustiva en las plataformas informáticas del Hospital (MIZAR–Alta Hospitalaria y Abucasis). Todos estos pacientes ya tenían realizadas al menos dos mediciones del GIMC. Con posterioridad a la finalización de las medidas de GIMC en 2016, y tras revisar los datos de los pacientes se recogió el fallecimiento de seis nuevos pacientes cuyas causas de defunción fueron más diversas y quedan recogidas en la Tabla 17.

**Tabla 16:** *Eventos vasculares durante el seguimiento de los pacientes coinfectados con el virus herpes humano 8*

	Variable	Todos los pacientes N=141	VHH-8 seropositivo N=43	VHH-8 seronegativo N=98
<b>2008 -2016</b>	Cardiopatía isquémica	<b>5</b>	0	5
	Enfermedad arterial periférica	<b>1</b>	0	1
<b>2017-2018</b>	Cardiopatía isquémica	2	1	1
	Ictus isquémico	2	2	0
<b>Eventos totales</b>		<b>10</b>	<b>3</b>	<b>7</b>

**Tabla 17:** *Pacientes fallecidos durante el estudio y hasta el año 2018*

	Variable	Todos los pacientes N=141	VHH-8 seropositivo N=43	VHH-8 seronegativo N=98
<b>2008 - 2016</b>	Neumonía	<b>1</b>	1	0
	Sepsis de origen respiratorio	<b>1</b>	1	0
	Causa desconocida	<b>2</b>	1	1
<b>2017 - 2018</b>	Leucoencefalopatía multifocal progresiva	1	0	1
	Neumonía	1	0	1
	Pancreatitis aguda (Nefropatía IV)	1	0	1
	Institucionalizado por trastorno bipolar/causa desconocida	1	0	1
	Causa desconocida	2	0	2
<b>Total ÉXITUS</b>		<b>10</b>	<b>3</b>	<b>7</b>

## 7. DISCUSIÓN

Entre los resultados más importantes del estudio destaca la relación observada entre la coinfección por dos herpes virus humanos de transmisión sexual, el VHS-2 y sobre todo el VHH-8, con una progresión más rápida del GIMC en PVVIH. Para los análisis seleccionamos HSH con infección por el VIH y carga viral plasmática suprimida y ajustamos los modelos estadísticos teniendo en cuenta los factores de riesgo cardiovascular. El estudio también mostró que había una fuerte asociación entre una mayor puntuación en la escala de riesgo de Framingham y la progresión del GIMC. La puntuación en la escala Framingham también se asoció de manera independiente al riesgo de incrementar el número de placas ateroscleróticas carotídeas respecto al estado basal o al desarrollo de eventos cardiovasculares durante el estudio. Con los hallazgos mencionados, creemos que el VHH-8, sumado a otros factores, podría contribuir a la progresión del GIMC, un marcador subrogado de aterosclerosis, en las PVVIH con carga viral suprimida y esto se pondría más de relieve cuando también se existe coinfección con el VHS- 2.

Entre las fortalezas del estudio se encuentra el diseño longitudinal, cosa que permite evaluar de manera más precisa cuál es el papel que desempeña un agente infeccioso en la evolución de la aterosclerosis que la ofrecida por los estudios transversales. A día de hoy existen pocos estudios que hayan valorado la relación ente los herpesvirus y la aterosclerosis subclínica en PVVIH con un diseño longitudinal. Aunque se ha descrito la relación entre el VHS-2 y el VVZ, con la aterosclerosis subclínica en PVVIH, se había valorado mediante estudios transversales (22,23,25). Hasta la fecha, con un diseño longitudinal, solamente se había establecido una asociación entre la infección por CMV y la progresión de la aterosclerosis en PVVIH (24).

### 7.1. Población del estudio

La población que se incluye en el estudio, compuesto por HSH, es representativa de uno de los grupos predominantes que integran actualmente las cohortes de pacientes con VIH de los países desarrollados. Es relevante reseñar que el VHH-8 es un gammaherpesvirus de transmisión sexual muy prevalente en los HSH y especialmente en aquellos que están infectados por el VIH. En comparación con la población general, en PVVIH el riesgo de infección por VHH-8 sería de aproximadamente el doble respecto a los seronegativos para el VIH (37) y de entre tres y cuatro veces más en los HSH (33).

### 7.2. Efecto de las coinfecciones por virus herpes humano 8 y virus herpes simple 2 en la progresión de la aterosclerosis subclínica

En nuestro estudio evaluamos de manera longitudinal los factores de riesgo que podrían asociarse con la tasa de progresión de la aterosclerosis subclínica a través de la medición del GIMC. En los resultados encontramos una asociación de la coinfección simultánea con el VHH-8 y el VHS-2 con la progresión de GIMC. Sin embargo, cabe decir que cuando se evaluó el papel de cada virus de manera independiente, encontramos que únicamente el VHH-8 mantenía una tendencia a una asociación estadísticamente significativa con la progresión del GIMC, mientras que la asociación con el VHS-2, encontrada previamente en el análisis univariante, no se confirmó en el análisis multivariante.

El VHS-2 es un herpesvirus de transmisión sexual que causa el herpes genital. Se ha asociado con aterosclerosis coronaria subclínica estimada a través de la medición del calcio de las arterias coronarias en un estudio transversal con tomografía axial computarizada (TAC) en PVVIH (25) e incluso se ha sugerido que podría ser un factor de riesgo en la población general para el desarrollo de aterosclerosis (49). Respecto al VHH-8, anteriormente se han descrito posibles propiedades proaterogénicas en estudios *in vitro* en la pared vascular y también se ha hallado una mayor frecuencia de lesiones ateromatosas macroscópicas en pacientes con SK en estudios post-mortem, hechos que

podrían apoyar la hipótesis del papel del virus en la aterogénesis (32), aunque lo cierto es que hasta la fecha, no se han publicado estudios clínicos que hayan documentado la asociación de la infección por VHH-8 con la enfermedad aterosclerótica.

### **7.3. Influencia de resto de coinfecciones en la progresión de la aterosclerosis subclínica**

En los análisis que realizamos también se incluyeron otros herpesvirus prevalentes como el CMV y el VVZ.

En nuestro estudio no se halló asociación entre VVZ y la progresión del GIMC o el aumento del número de placas. Se ha sugerido que el VVZ podría estar asociado a un mayor riesgo de enfermedad arterial periférica (26) y de síndrome coronario agudo (27). Respecto a la relación del VVZ con la aterosclerosis subclínica en PVVIH, se ha descrito una asociación entre mayores títulos de inmunoglobulina G (IgG) del VVZ con GIMC aumentado y con el nivel de marcadores inflamatorios en un estudio transversal (22). Respecto al CMV, no se halló tampoco una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de IgG y la progresión del GIMC o un aumento en el número de placas en nuestro estudio. En PVVIH se ha descrito que el CMV está asociado a inmunosenescencia (50) y también se ha encontrado una asociación entre títulos mayores de IgG de CMV y una medida mayor del GIMC (28) y con calcificación de las arterias coronarias en estudios transversales (51), además de una influencia sobre la progresión del GIMC (24). Un posible motivo por el cual no se ha hallado asociación de estos herpesvirus con la progresión del GIMC en nuestro estudio es el elevado número de pacientes coinfectados de nuestra cohorte por VVZ (96%) y por CMV (91%) lo que dificulta comparar si existe asociación entre la progresión del GIMC teniendo en cuenta únicamente la presencia o no de IgG de VVZ o CMV sin tener en cuenta el nivel de los títulos.

#### 7.4. Efecto de la inflamación sobre la aterosclerosis asintomática

Es llamativo observar que los pacientes coinfectados con el VHH-8 mostraron niveles de inflamación, medidos con la PCRUS, que resultaron más elevados que los de los no coinfectados. Esto concuerda con los hallazgos descritos previamente sobre la asociación entre VHH-8 con la activación inmune y un incremento de la inflamación en PVVIH con carga viral no detectable (22). La PCRUS es uno de los biomarcadores de riesgo cardiovascular mejor caracterizados. Se ha comparado de manera directa con varios marcadores inflamatorios y se ha asociado de manera independiente con el riesgo de desarrollar eventos coronarios (52).

La inflamación se considera un factor capital que actúa sobre la patogénesis de la aterosclerosis (53,54). Los agentes patógenos infecciosos también se han visto implicados en el origen de la aterogénesis, esto se produciría tanto a través de mecanismos directos de infección sobre las células de la pared del vaso sanguíneo, donde activan una respuesta inflamatoria a nivel local, como a través de una reacción inflamatoria a nivel sistémico, y que es mediada por células inflamatorias y citoquinas inflamatorias, que podrían exacerbar los procesos aterogénicos que ocurren a nivel de la pared del vaso sanguíneo (55). La infección por otros copatógenos también se ha incluido entre los factores que contribuyen a la situación de inflamación persistente y a la activación inmune que se produce en la infección crónica por el VIH. Las coinfecciones se han implicado en la patogénesis de los ENOS, entre los que se incluye la patología cardiovascular (56).

Por otro lado, los mayores niveles de PCRUS también se asociaron en nuestro estudio a una progresión más rápida del GIMC. Este hallazgo podría apuntar a la inflamación sistémica como uno de los mecanismos patógenos subyacentes que participan en la progresión de la aterosclerosis en PVVIH coinfectadas con VHH-8, además de los posibles efectos locales virales descritos en las células vasculares endoteliales. Esta acción a nivel sistémico del VHH-8 a través de la inflamación también podría explicar por qué se produjo la atenuación de la significación estadística entre la asociación entre el VHH-8 y la progresión del GIMC cuando las variables PCRUS y VHH-8 coexistieron en el mismo modelo.

Por tanto, el efecto de las coinfecciones sobre la aterosclerosis podría ser, el menos de manera parcial, mediado a través de la inflamación sistémica, como así lo demuestran los niveles más elevados de PCRUS que se asocian a la coinfección por VHH-8.

El efecto proinflamatorio a nivel sistémico del VHH-8 que vemos reflejado a través de la PCRUS, también podría servir de explicación para buscar la causa que ha llevado a los pacientes del estudio coinfectados con el VHH-8 a tener una medida de GIMC al inicio del estudio con tendencia a ser mayor que los no coinfectados. Estos niveles de GIMC basales más altos en los pacientes coinfectados con VHH-8 también podrían ser un factor de riesgo asociado a una mayor progresión de GIMC. No obstante, cuando se analizó la progresión del GIMC, se realizó un ajuste por los niveles basales de GIMC.

El bulbo carotídeo es una región donde ya se ha descrito anteriormente que la aterosclerosis progresa en mayor medida en las PVVIH (14). La bifurcación de la carótida o bulbo carotídeo es un lugar donde la tensión de cizallamiento o tensión hemodinámica generada por el flujo sanguíneo es menor, como se ha visto en determinados segmentos de las bifurcaciones arteriales. Se ha planteado la hipótesis de que esto podría aumentar la susceptibilidad vascular a los efectos de la inflamación crónica. En consecuencia, y de manera similar a los hallazgos de nuestro estudio, la progresión del GIMC en el bulbo se ha asociado previamente con niveles mayores de PCRUS en PVVIH (14,57) y en población seronegativa para el VIH (58).

Los hallazgos obtenidos en este estudio respaldarían el papel que desempeñan los herpesvirus, y apoyarían de esta manera la hipótesis de la “carga infecciosa” sobre la patogénesis de la aterosclerosis como así han informado con anterioridad otros autores (25,59).

## 7.5. Efecto de los factores de riesgo tradicionales en la progresión de la aterosclerosis subclínica

En nuestro estudio también se evaluó el efecto de los factores de riesgo tradicionales sobre la progresión del GIMC. En el modelo univariante se encontró asociación con la edad, la dislipemia, la hipertensión y la puntuación de riesgo de Framingham.

En PVVIH los factores de riesgo tradicional se han asociado a GIMC aumentado (60). Es importante resaltar la importancia de la edad, a la hora de tener en cuenta el riesgo vascular. En PVVIH se ha descrito que en adultos mayores la asociación entre aumentos de tensión arterial y el GIMC pueden intensificarse con la edad (61).

Un hallazgo de especial relevancia en nuestro estudio es la fuerte asociación que ha mostrado la puntuación en la escala riesgo de Framingham con la progresión del GIMC en las PVVIH, que se ha mantenido significativa en los diferentes análisis estadísticos que se realizaron.

Los resultados del estudio apoyan también el papel central que desempeñan los factores de riesgo cardiovascular tradicionales en la patogénesis y desarrollo de la aterosclerosis en la población que vive con el VIH. El efecto del VIH sobre la arteria carótida puede cambiar a lo largo de la vida; se cree que en adultos mayores los factores de riesgo tradicionales desempeñarían un papel más importante que en los adultos jóvenes, donde el peso de la infección por VIH es mayor (61). Estos hallazgos refuerzan la importancia de mantener de manera prioritaria un control estricto de los factores de riesgo cardiovascular entre las medidas necesarias para disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares en las PVVIH.

## 7.6. Limitaciones y fortalezas del estudio

El estudio tiene algunas limitaciones. La primera es que se centró en la progresión del GIMC y, por lo tanto, los resultados no se pueden extrapolar a todos los individuos que tengan coinfección con el VIH y el VHH-8. En el estudio se analizó la progresión

del GIMC y los factores que pueden contribuir a una progresión más rápida del GIMC en su conjunto y no tanto el efecto neto del VHH-8 y del VHH-2 sobre la evolución del GIMC. En segundo lugar, la mayoría de los cofactores, a excepción del recuento de células CD4 y de la carga viral del VIH medida con el ARN, únicamente se midieron al inicio del estudio. Sería posible, por tanto, que pudieran haberse producido cambios a lo largo del tiempo que duró el estudio. Además, no podemos descartar que hubiese nuevas coinfecciones por el VHH-8 durante el seguimiento en aquellos pacientes que inicialmente fueron seronegativos. Sin embargo, según estudios epidemiológicos que se han publicado anteriormente, el riesgo de seroconversión es muy bajo (1,4 por 1000 personas susceptibles) (62) y sería poco probable que pudieran verse afectados los resultados finales.

Otra posible limitación sería el método diagnóstico utilizado para identificar a los pacientes con infección por VHH-8 mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta que detecta inmunoglobulina G frente al VHH-8. Aunque es la prueba más sensible, ningún ensayo individual es completamente sensible y específico (45) ni totalmente infalible. Por lo tanto, no es del todo imposible una clasificación errónea en pacientes infectados o no por el VHH-8.

Aunque la población que se incluye en el estudio es representativa de las cohortes de los países desarrollados, la extrapolación de los resultados podría ser incierta en el caso de países en vías de desarrollo como los pertenecientes a la zona de África subsahariana, donde es más difícil encontrar estudios sobre VHH-8 y HSH a pesar de la alta prevalencia de coinfección y de SK en estos países (33).

Finalmente, aunque se ha establecido una fuerte asociación entre GIMC y los eventos cardiovasculares, la asociación entre la progresión individual del GIMC y los eventos futuros de enfermedad cardiovascular sigue sin poder demostrarse (63,64).

Una de las principales fortalezas del estudio es su diseño longitudinal, que permite valorar la influencia de las coinfecciones sobre la evolución del GIMC a lo largo del tiempo. Consideramos que la población seleccionada era adecuada para los objetivos del estudio ya que el porcentaje de pacientes con infección por VHH-8 fue del 30,1%, cifra

similar a registrada en una revisión sistemática donde se ha estudiado la prevalencia del VHH-8 en HSH, en la que se ha descrito una seroprevalencia de VHH-8 entre las PVVIH de aproximadamente el 33% y un riesgo de exposición al VHH-8 de hasta casi cuatro veces mayor (33).

Otra de las fortalezas del estudio es la consistencia que se ha observado entre los diferentes análisis realizados, tal como sugiere, por ejemplo, la estrecha asociación entre la puntuación en la escala de riesgo de Framingham y los valores que están relacionados con el GIMC y su progresión en los diferentes modelos realizados.



## 8. CONCLUSIONES

En las las personas que viven con el VIH que se encuentran virológicamente suprimidas, la coinfección por el VHH-8 podría contribuir a una progresión más rápida del GIMC.

Este efecto potencial del VHH-8 es más evidente cuando se produce una coinfección simultánea con el VHS-2.

El efecto del VHH-8 sobre la progresión del GIMC podría estar mediado por la inflamación sistémica producida por este virus.

La inflamación sistémica medida por la proteína C reactiva se asocia a una mayor progresión del GIMC.

En nuestro estudio no encontramos asociación entre el recuento de linfocitos CD4+ y la progresión del GIMC.

Los factores de riesgo cardiovascular tradicionales tienen un papel destacado en la progresión del GIMC en la población de las personas que viven con el VIH.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. López C, Masiá M, Padilla S, Aquilino A, Bas C, Gutiérrez F. Deaths due to non-AIDS diseases among HIV infected patients: A 14-year study (1998-2011) | Muertes por enfermedades no asociadas directamente con el sida en pacientes con infección por el VIH: Un estudio de 14 años (1998-2011). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34(4):222-7.
2. Mocroft A, Reiss P, Gasiorowski J, Ledergerber B, Kowalska J, Chiesi A, et al. Serious fatal and nonfatal non-AIDS-defining illnesses in Europe. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. octubre de 2010 [citado 15 de septiembre de 2013];55(2):262-70.
3. Causes of death in HIV-1-infected patients treated with antiretroviral therapy, 1996-2006: collaborative analysis of 13 HIV cohort studies. *Clin Infect Dis*. mayo de 2010;50(10):1387-96.
4. Palella FJJ, Baker RK, Moorman AC, Chmiel JS, Wood KC, Brooks JT, et al. Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. septiembre de 2006;43(1):27-34.
5. Grinspoon SK, Grunfeld C, Kotler DP, Currier JS, Lundgren JD, Dubé MP, et al. State of the science conference: Initiative to decrease cardiovascular risk and increase quality of care for patients living with HIV/AIDS: executive summary. *Circulation* [Internet]. 8 de julio de 2008 [citado 13 de agosto de 2013];118(2):198-210.
6. Currier JS, Lundgren JD, Carr A, Klein D, Sabin CA, Sax PE, et al. Epidemiological evidence for cardiovascular disease in HIV-infected patients and relationship to highly active antiretroviral therapy. *Circulation* [Internet]. 8 de julio de 2008 [citado 15 de septiembre de 2013];118(2):e29-35.

7. Grover SA, Coupal L, Gilmore N, Mukherjee J. Impact of dyslipidemia associated with Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) on cardiovascular risk and life expectancy. *Am J Cardiol* [Internet]. 1 de marzo de 2005 [citado 15 de septiembre de 2013];95(5):586-91.
8. Kamin DS, Grinspoon SK. Cardiovascular disease in HIV-positive patients. *AIDS* [Internet]. 29 de abril de 2005 [citado 15 de septiembre de 2013];19(7):641-52.
9. Tseng ZH, Secemsky EA, Dowdy D, Vittinghoff E, Moyers B, Wong JK, et al. Sudden Cardiac Death in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 22 de mayo de 2012;59(21):1891-6.
10. Baldassarre D, Veglia F, Hamsten A, Humphries SE, Rauramaa R, De Faire U, et al. Progression of carotid intima-media thickness as predictor of vascular events: Results from the IMPROVE study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(9):2273-9.
11. Barth JD, Roberts CK. Carotid intima-media thickness and coronary atherosclerosis: weak or strong relations? *Eur Heart J* [Internet]. 2007;28(20):2552-2552.
12. Delaney JAC, Wanke C, Currier JS, Scherzer R, Biggs ML, Tien PC, et al. Preclinical atherosclerosis due to HIV infection: carotid intima-medial thickness measurements from the FRAM study. *AIDS* [Internet]. 2009;23(14):1841-9.
13. Hsue PY, Hunt PW, Schnell A, Kalapus SC, Hoh R, Ganz P, et al. Role of viral replication, antiretroviral therapy, and immunodeficiency in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS* [Internet]. 2009;23(9):1059-67.
14. Hsue PY, Scherzer R, Hunt PW, Schnell A, Bolger AF, Kalapus SC, et al. Carotid Intima-Media Thickness Progression in HIV-Infected Adults Occurs Preferentially at the Carotid Bifurcation and Is Predicted by Inflammation. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 24 de abril de 2012 [citado 9 de agosto de 2013];1(2):jah3-e000422.
15. Hultén E, Mitchell J, Scally J, Gibbs B, Villines TC. HIV positivity, protease inhibitor exposure and subclinical atherosclerosis: a systematic review and meta-

- analysis of observational studies. *Heart* [Internet]. noviembre de 2009 [citado 17 de septiembre de 2013];95(22):1826-35.
16. Bongiovanni M, Casana M, Cicconi P, Pisacreta M, Codemo R, Pelucchi M, et al. Predictive factors of vascular intima media thickness in HIV-positive subjects. *J Antimicrob Chemother.* enero de 2008;61(1):195-9.
  17. Kaplan RC, Kingsley LA, Gange SJ, Benning L, Jacobson LP, Lazar J, et al. Low CD4+ T-cell count as a major atherosclerosis risk factor in HIV-infected women and men. *AIDS* [Internet]. 20 de agosto de 2008 [citado 17 de septiembre de 2013];22(13):1615-24.
  18. Gutiérrez F, Masiá M. ¿Es la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana una enfermedad inflamatoria? *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2012;138(4):157-9.
  19. Boccara F, Lang S, Meuleman C, Ederhy S, Mary-Krause M, Costagliola D, et al. HIV and coronary heart disease: time for a better understanding. *J Am Coll Cardiol.* febrero de 2013;61(5):511-23.
  20. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* abril de 2005;352(16):1685-95.
  21. Ibrahim AI, Obeid MT, Jouma MJ, Moasis GA, Al-Richane WL, Kindermann I, et al. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in atherosclerotic plaques and in unaffected bypass grafts. *J Clin Virol.* enero de 2005;32(1):29-32.
  22. Masiá M, Robledano C, De La Tabla VO, Antequera P, Lumbreras B, Hernández I, et al. Coinfection with human herpesvirus 8 is associated with persistent inflammation and immune activation in virologically suppressed HIV-infected patients. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(8):1-5.
  23. Hsue P, Hunt PW, Sinclair E, Brecht B, Franklin A, Killian M, et al. Increased carotid intima-media thickness in HIV patients is associated with increased cytomegalovirus-specific T-cell responses. *AIDS* [Internet]. 2006;20(18):2275-83.

24. Sacre K, Hunt PW, Hsue PY, Maidji E, Martin JN, Deeks SG, et al. A role for cytomegalovirus-specific CD4 +CX3CR1 + T cells and cytomegalovirus-induced T-cell immunopathology in HIV-associated atherosclerosis. *Aids* [Internet]. 2012;26(6):805-14.
25. Hechter RC, Budoff M, Hodis HN, Rinaldo CR, Jenkins FJ, Jacobson LP, et al. Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) as a coronary atherosclerosis risk factor in HIV-infected men: multicenter AIDS cohort study. *Atherosclerosis*. agosto de 2012;223(2):433-6.
26. Lin T-Y, Yang F-C, Lin C-L, Kao C-H, Lo H-Y, Yang T-Y. Herpes zoster infection increases the risk of peripheral arterial disease: A nationwide cohort study. *Medicine (Baltimore)*. agosto de 2016;95(35):e4480.
27. Wang CC, Lin CL, Chang YJ, Wang GJ, Sung FC, Kao CH. Herpes zoster infection associated with acute coronary syndrome: A population-based retrospective cohort study. *Br J Dermatol*. 2014;170(5):1122-9.
28. Masia M, Robledano C, Ortiz de la Tabla V, Antequera P, Lopez N, Gutierrez F, et al. Increased Carotid Intima-Media Thickness Associated with Antibody Responses to Varicella-Zoster Virus and Cytomegalovirus in HIV-Infected Patients. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(5):1-6.
29. Masiá M, Padilla S, Robledano C, Ramos JMJM, Gutiérrez F, Gutierrez F. Evaluation of endothelial function and subclinical atherosclerosis in association with hepatitis C virus in HIV-infected patients: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2011;11(1):265.
30. Carletti F, Mandolini C, Rossi A, Capobianchi MR, Borgia MC. Prevalence of human herpesvirus (HHV)-8 infection among carriers of cardiovascular disease. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2002;16(2):110-3.
31. Auten M, Kim AS, Bradley KT, Rosado FG. Human herpesvirus 8-related diseases: Histopathologic diagnosis and disease mechanisms. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2017;34(4):371-6.

32. Grahame-Clarke C, Alber DG, Lucas SB, Miller R, Vallance P. Association between Kaposi's sarcoma and atherosclerosis: implications for gammaherpesviruses and vascular disease. *AIDS*. septiembre de 2001;15(14):1902-4.
33. Liu Z, Fang Q, Zuo J, Chen Y, Minhas V, Wood C, et al. Global epidemiology of human herpesvirus 8 in men who have sex with men: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol*. 2018;90(3):582-91.
34. Crabtree KL, Wojcicki JM, Minhas V, Smith DR, Kankasa C, Mitchell CD, et al. Risk factors for early childhood infection of human herpesvirus-8 in zambian children: The role of early childhood feeding practices. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(2):300-8.
35. Hannachi N, Ben Fredj N, Samoud S, Ferjani A, Khlif A, Boughammoura L, et al. Seroprevalence and risk factors of human herpes virus 8 infection in Central-East Tunisia. *Pathol Biol*. octubre de 2012;60(5):282-6.
36. Gutierrez F, Masia M, Padilla S, Ramos JM, Bernal E, Morales P, et al. Occult lymphadenopathic Kaposi's sarcoma associated with severe pulmonary hypertension: A clinical hint about the potential role of HHV-8 in HIV-related pulmonary hypertension? *J Clin Virol*. octubre de 2006;37(2):79-82.
37. Rohner E, Wyss N, Heg Z, Faralli Z, Mbulaiteye SM, Novak U, et al. HIV and human herpesvirus 8 co-infection across the globe: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2016;138(1):45-54.
38. Bègré L, Rohner E, Mbulaiteye SM, Egger M, Bohlius J. Is human herpesvirus 8 infection more common in men than in women? Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2016;139(4):776-83.
39. Mariggìo G, Koch S, Schulz TF. Kaposi sarcoma herpesvirus pathogenesis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2017;372(1732):20160275.
40. De Paoli P, Carbone A. Kaposi's Sarcoma herpesvirus: Twenty years after its discovery. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(7):1288-94.

41. Bhutani M, Polizzotto MN, Uldrick TS, Yarchoan R. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-associated malignancies: epidemiology, pathogenesis, and advances in treatment. *Semin Oncol.* abril de 2015;42(2):223-46.
42. Goncalves PH, Ziegelbauer J, Uldrick TS, Yarchoan R. Kaposi sarcoma herpesvirus-associated cancers and related diseases. *Curr Opin HIV AIDS.* enero de 2017;12(1):47-56.
43. Schulz TF, Cesarman E. Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus: mechanisms of oncogenesis. *Curr Opin Virol.* octubre de 2015;14:116-28.
44. Hsu DC, Ma YF, Hur S, Li D, Rupert A, Scherzer R, et al. Plasma IL-6 levels are independently associated with atherosclerosis and mortality in HIV-infected individuals on suppressive antiretroviral therapy. *AIDS.* agosto de 2016;30(13):198-202.
45. Spira TJ, Lam LEE, Dollard SC, Pau CP, Black JB, Burns D, et al. Comparison of Serologic Assays and PCR for Diagnosis of Human Herpesvirus 8 Infection. *JAMA.* 2000;38(6):2174-80.
46. Hsue PY, Lo JC, Franklin A, Bolger AF, Martin JN, Deeks SG, et al. Progression of atherosclerosis as assessed by carotid intima-media thickness in patients with HIV infection. *Circulation [Internet].* 6 de abril de 2004 [citado 9 de agosto de 2013];109(13):1603-8.
47. Zócalo Y, Bia D. Ultrasonografía carotídea para detección de placas de ateroma y medición del espesor íntima-media; índice tobillo-brazo: evaluación no invasiva en la práctica clínica. *Rev Uruguaya Cardiol.* 2016;31(1):47-60.
48. Lichtenstein KA, Armon C, Buchacz K, Chmiel JS, Buckner K, Tedaldi EM, et al. Low CD4+ T cell count is a risk factor for cardiovascular disease events in the HIV outpatient study. *Clin Infect Dis.* agosto de 2010;51(4):435-47.

49. Wu YP, Sun DD, Wang Y, Liu W, Yang J. Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 Infection Increases Atherosclerosis Risk: Evidence Based on a Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2016;2016.
50. Ballegaard V, Braendstrup P, Pedersen KK, Kirkby N, Stryhn A, Ryder LP, et al. Cytomegalovirus-specific T-cells are associated with immune senescence, but not with systemic inflammation, in people living with HIV. *Sci Rep.* febrero de 2018;8(1):3778.
51. Knudsen A, Kristoffersen US, Panum I, Hansen YB, Skottrup PD, Hasbak P, et al. Coronary artery calcium and intima-media thickness are associated with level of cytomegalovirus immunoglobulin G in HIV-infected patients. *HIV Med.* 2018;2018-20.
52. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* marzo de 2000;342(12):836-43.
53. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* enero de 1999;340(2):115-26.
54. Anderson JL, Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, Elmer SP. Evaluation of C-reactive protein, an inflammatory marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* julio de 1998;32(1):35-41.
55. Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, Csako G, Waclawiw MA, Shearer GM, et al. Effects of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-reactive protein levels. *Am J Cardiol.* enero de 2000;85(2):140-6.
56. Boulougoura A, Sereti I. HIV infection and immune activation: the role of coinfections. *Curr Opin HIV AIDS.* marzo de 2016;11(2):191-200.
57. Hileman CO, Longenecker CT, Carman TL, McComsey GA. C-reactive protein predicts 96-week carotid intima media thickness progression in HIV-infected

- adults naive to antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2014;65(3):340-4.
58. Toprak A, Kandavar R, Toprak D, Chen W, Srinivasan S, Xu JH, et al. C-reactive protein is an independent predictor for carotid artery intima-media thickness progression in asymptomatic younger adults (from the Bogalusa Heart Study). *BMC Cardiovasc Disord.* diciembre de 2011;11:78.
59. Espinola-Klein C, Rupprecht H-J, Blankenberg S, Bickel C, Kopp H, Victor A, et al. Impact of infectious burden on progression of carotid atherosclerosis. *Stroke.* noviembre de 2002;33(11):2581-6.
60. Freitas P, Carvalho D, Santos AC, Madureira AJ, Martinez E, Pereira J, et al. Carotid intima media thickness is associated with body fat abnormalities in HIV-infected patients. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2014;14:348.
61. Hanna DB, Guo M, Bůžková P, Miller TL, Post WS, Stein JH, et al. HIV Infection and Carotid Artery Intima-media Thickness: Pooled Analyses Across 5 Cohorts of the NHLBI HIV-CVD Collaborative. *Clin Infect Dis.* 2016;63(2):249-56.
62. Melbye M, Cook PM, Hjalgrim H, Begtrup K, Simpson GR, Biggar RJ, et al. Risk factors for Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) seropositivity in a cohort of homosexual men, 1981-1996. *Int J cancer.* agosto de 1998;77(4):543-8.
63. Lorenz MW, Polak JF, Kavousi M, Mathiesen EB, Völzke H, Tuomainen TP, et al. Carotid intima-media thickness progression to predict cardiovascular events in the general population (the PROG-IMT collaborative project): A meta-analysis of individual participant data. *Lancet* [Internet]. 2012;379(9831):2053-62.
64. Kokubo Y, Watanabe M, Higashiyama A, Nakao YM, Nakamura F, Miyamoto Y. Impact of Intima-Media Thickness Progression in the Common Carotid Arteries on the Risk of Incident Cardiovascular Disease in the Suita Study. *J Am Heart Assoc.* junio de 2018;7(11).

## 10. ANEXO: PUBLICACIONES



# Contribution of Human Herpesvirus 8 and Herpes Simplex Type 2 to Progression of Carotid Intima-Media Thickness in People Living With HIV

Fernando Lidón,<sup>1</sup> Sergio Padilla,<sup>1</sup> Jose A. García,<sup>2</sup> Marta Fernández,<sup>1</sup> Javier García,<sup>1</sup> Victoria Ortiz de la Tabla,<sup>3</sup> Félix Gutiérrez,<sup>1,a</sup> and Mar Masía<sup>1,a</sup>

<sup>1</sup>Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche and Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain; <sup>2</sup>Statistics, Centro de Investigación Operativa, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, Spain; <sup>3</sup>Microbiology Service, Hospital Universitario de San Juan, Alicante, Spain

**Background.** Human herpesvirus 8 (HHV-8) is a lymphotropic and vasculotropic herpesvirus with potential pro-atherogenic effects. We explored the influence of coinfection with HHV-8 and other herpesviruses on the rate of progression of carotid intima-media thickness (cIMT) in virologically suppressed people living with HIV (PLWH).

**Methods.** Prospective cohort study including men who have sex with men (MSM) infected with HIV. At the baseline visit, IgG antibodies against HHV-8 and other herpesviruses, highly sensitive C-reactive protein (hsCRP) levels, and Framingham risk scores were measured. To evaluate the progression of cIMT, successive measurements with high-resolution carotid artery ultrasound were performed over an 8-year period. Adjusted general linear mixed models were used to assess factors associated with faster cIMT progression.

**Results.** One hundred forty-one participants with suppressed HIV-RNA (<200 copies/mL) at cIMT measurement during the study period were included. Forty-six (31.3%) were coinfecting with HHV-8 and 76 (54%) with herpes simplex virus 2 (HSV-2). Factors associated with faster cIMT progression adjusting for CD4 cell counts, time between cIMT measurements, hepatitis C, varicella zoster virus, and cytomegalovirus coinfection were seropositivity for HHV-8 ( $P = .059$ ), HSV-2+HHV-8 coinfection ( $P = .027$ ), Framingham risk score ( $P = .057$ ), and hsCRP ( $P = .027$ ). Coinfection with HHV-8 was independently associated with higher levels of hsCRP (odds ratio, 1.09; 95% confidence interval, 1.02 to 1.17;  $P = .016$ ). When hsCRP and HHV-8 were simultaneously included in the adjusted model, the relationship of HHV-8 with cIMT progression was attenuated.

**Conclusions.** HHV-8 might contribute to progression of cIMT with a more prominent role when it coinfects with HHV-2 in virologically suppressed PLWH, and this effect could be driven by systemic inflammation.

**Keywords:** atherosclerosis progression; highly sensitive C-reactive protein; human herpesvirus 8; inflammation; intima-media thickness; subclinical atherosclerosis.

Cardiovascular disease (CVD) is one of the leading causes of morbidity and mortality in people living with HIV (PLWH) [1]. Compared with the general population, PLWH are at increased risk of cardiovascular events, to which different causes including traditional cardiovascular risk factors, antiretroviral therapy (ART), and HIV-associated chronic inflammation and immune activation have been implicated [2, 3].

Chronic immune activation and inflammation are main factors involved in the pathogenesis of atherosclerosis [4]. Despite

successful ART, persistent residual inflammation does occur in PLWH [5], and infection with co-pathogens is one of the suggested contributing mechanisms. *Herpesviridae* are highly prevalent among PLWH. This family of viruses has been particularly implicated in the pathogenesis of atherosclerosis [6]. Some of their members, including cytomegalovirus, herpes simplex virus type 2 (HSV-2), and varicella zoster virus, have been linked with subclinical atherosclerosis in PLWH in cross-sectional studies [7–9]. To date, only cytomegalovirus, through induction of cytomegalovirus-specific T cells, has been demonstrated in longitudinal studies to be associated with progression of atherosclerosis within this population [10].

Among *Herpesviridae*, human herpesvirus 8 (HHV-8) stands out as an attractive candidate to be involved in atherosclerosis. HHV-8 is a lymphotropic and vasculotropic herpesvirus linked with Kaposi's sarcoma, and possibly with pulmonary hypertension in PLWH [11]. Because of the ability of HHV-8-infected vascular endothelial cells to induce the expression of growth factors that cause angiogenesis, endothelial cell proliferation, enhanced vascular permeability, and cytokine production, it

Received 29 November 2018; editorial decision 20 January 2019; accepted 23 January 2019.

<sup>a</sup>Equal contribution

Correspondence: Mar Masía, MD, Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario de Elche, Camí de la Almazara 11, 03203 Elche, Spain (marmasiac@gmail.com).

Open Forum Infectious Diseases®

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)  
DOI: 10.1093/ofid/ofz041

had been suggested that HHV-8 could be involved in atherogenesis, but data are very limited [12]. In a previous study, we found that coinfection with HHV-8 was associated with increased inflammation and immune activation in virologically suppressed PLWH [13]. In the current investigation, we explored whether HHV-8 coinfection, as well as coinfection with other herpesviruses, was associated with faster progression of subclinical atherosclerosis, as assessed by longitudinal measurements of carotid intima-media thickness (cIMT).

## METHODS

### Study Population

The study was carried out in a cohort of adult PLWH cared for in the outpatient clinic of Elche University Hospital in Spain. Consecutive HIV-infected adult MSM, because of their increased risk for HHV-8 infection, willing to enroll in a longitudinal investigation including serial cIMT ultrasound measurements were prospectively invited to participate in the study. To avoid the confounding effect of HIV replication, only participants with virological suppression at cIMT measurement, defined as a viral load <200 copies/mL, were analyzed. Participants with a history of coronary heart disease were excluded. The study was approved by the local ethics committee (Comité Ético del Hospital General Universitario de Elche), and all included subjects signed an informed consent.

### Data Collection

Demographic, clinical, and laboratory variables were collected at the baseline visit, occurring between January 2008 and April 2012. The last cIMT measurement occurred in October 2016. To evaluate the progression of subclinical atherosclerosis, successive cIMT measurements with high-resolution B-mode carotid artery ultrasound were performed to study participants using a standardized protocol, as previously described [14]. Three measures were taken from the right and left common carotid and bulb portions. Total cIMT at the common carotids and at the bulbs was calculated with the mean of all right and left measurements and analyzed as a continuous variable. The carotid bulbs were chosen to assess cIMT progression because of the higher progression rates described at this location in PLWH [15]. Carotid plaque was defined as a localized cIMT measure >1.5 mm. To minimize variability, all measurements were performed by the same investigator (M.M.), who was blinded to patients' clinical details and to previous scans. cIMT measurements were performed with approximately annual to biannual frequency.

At the baseline visit, a blood sample was collected for routine tests and serological and biomarker measurement. IgG antibodies against the majority of the herpesviruses were measured by commercial enzyme-linked immunosorbent assay test kits: FOCUS Diagnostics (Cypress, CA, U.S.A) for HSV-2; Vircell SL (Granada, Spain) for varicella zoster virus (VZV), and Siemens

Healthcare Diagnostics (Barcelona, Spain) for cytomegalovirus (CMV). HHV-8 coinfection was assessed with the Indirect Fluorescent Assay (Advanced Biotechnologies Inc., MD, U.S.A). This latest test provided qualitative but not quantitative determination of IgG antibodies. Highly sensitive C-reactive protein (hsCRP) was measured with a chemiluminescent immunometric assay (Immulite 2000, Siemens, Madrid, Spain). Infection with hepatitis C virus (HCV) was defined by a positive serology plus a positive HCV RNA by polymerase chain reaction. CD4+ and CD8+ cell counts and HIV RNA were measured at baseline and every 6 months throughout the study period. Hypertension, diabetes, and dyslipidemia were defined by a previous diagnosis or by a current prescription of pharmacological therapy for any of the risk factors.

Cardiovascular risk factors were managed at the clinic according to a standard protocol. For lipid management, the therapeutic goal for low-density lipoprotein cholesterol was <130 mg/dL; lipid-lowering agents were initiated after dietary therapy failure. Blood pressure target goals were <140 mmHg for systolic and <90 mmHg for diastolic blood pressure. For patients with diabetes or renal disease, the target goals were <130/80 mmHg. To achieve blood pressure target goals, a predefined protocol was implemented, starting with lifestyle modifications and sequentially adding the following drugs at each visit: (i) an angiotensin receptor blocker, (ii) a thiazide diuretic, and (iii) a calcium channel blocker or a  $\beta$ -blocker. In patients with confirmed diabetes mellitus, the goal was reducing the hemoglobin A1c level to <7%. To achieve this objective, a predefined protocol starting with metformin was followed. In patients with very high triglycerides ( $\geq 500$  mg/dL), the first priority was triglyceride lowering with diet and fenofibrate. The second priority was prevention of coronary heart disease with statins+ezetimibe. Weight loss and/or exercise were recommended, and smokers were strongly recommended to give up smoking.

### Statistical Analyses

Differences in demographic and clinical characteristics between patients with and without HHV-8 coinfection were assessed using the chi-square or Fisher exact test for categorical variables, and the Student *t* or Mann-Whitney *U* tests for continuous variables.

To assess progression of cIMT, we examined the individual change in cIMT on each measurement at the far wall of the left and right carotid bulbs over time. Factors associated with cIMT progression were analyzed using a general linear mixed model, with the individual patient as a random effect. All cIMT increments were selected for multivariate analysis, and the models were adjusted for the variables significantly associated with cIMT progression in the univariate analysis, as well as for coinfection with other herpesviruses, CD4 cell count values at cIMT measurement, and antiretroviral regimen composition, because of their association with cardiovascular disease in PLWH [7–9, 16].

The closest CD4 cell counts within 6 months before or after cIMT determination were chosen for analysis. To avoid overadjustment, the Framingham risk score, as a summary variable comprising all the individual cardiovascular risk factors, was selected for inclusion in the models to predict cIMT progression. Missing data were handled through listwise deletion. Statistical significance for these models was defined by a 2-sided *P* value <.05.

The association of HHV-8 coinfection with inflammation was assessed with a binomial general linear mixed model using a complementary log–log link, which was adjusted for the factors associated with HHV-8 seropositivity in the univariate analysis. The associations between HHV-8 coinfection and the risk of new developing plaques and cardiovascular events were examined by means of generalized linear models using as an offset term the time to event development or to the end of the study observation period. Variables included in the analyses were cardiovascular risk at baseline, assessed by Framingham risk score, CRP, HIV-related factors, type of ART, and coinfection with herpesviruses.

## RESULTS

### Patients Characteristics

The study included 141 consecutive participants receiving ART who remained suppressed (HIV RNA < 200 copies/mL)

at cIMT measurements during the study period; 9 participants with detectable HIV RNA levels at measurement were excluded. Baseline clinical data are shown in Table 1. Mean ( $\pm$ SD) age was 46 ( $\pm$ 13) years, and median (Q1–Q3) CD4 cell count was 608.5 (391.8–847.5) cells/ $\mu$ L. The most frequent antiretroviral regimens were based on protease inhibitors (PIs; 38% participants) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs; 31%). Forty-three (30.5%) participants were coinfecting with HHV-8, 76 (54%) with HSV-2, 135 (96%) with VZV, and 128 (94%) with CMV. Six patients developed vascular events during the study period: 5 coronary-related events and 1 peripheral artery disease.

### Factors Associated With Human Herpesvirus 8 Coinfection

Coinfection with HHV-8 was associated with higher levels of hsCRP (median [Q1–Q3], 3.77 [1.34–7.31] vs 1.89 [0.91–3.94] mg/L, *P* = .003, in HHV-8-coinfecting vs -noncoinfecting, respectively), and there was a marginal association with higher Framingham score (median [Q1–Q3], 9% [4.25%–15.0%] vs 6.0% [2.0%–12.0%], respectively, *P* = .053), with lower CD8 cell counts (866 [619.5–1144] cells/ $\mu$ L vs 1024.5 [713.5–1574.5] cells/ $\mu$ L, respectively, *P* = .053) and a lower frequency of hepatitis C coinfection (2% vs 13%, *P* = .063) (Table 1). Median baseline cIMT was higher among HHV-8-infected individuals (median [Q1–Q3], 1.0 [0.75–1.30] mm in HHV-8-infected

**Table 1. Baseline Characteristics of the Patients by Human Herpesvirus 8 Infection Serological Status**

Variable	All Patients (n = 141)	HHV-8-Seropositive (n = 43)	HHV-8-Seronegative (n = 98)	<i>P</i> Value
Age, mean (SD), y	46 (13)	49.31 (14.74)	44.95 (12.50)	.090
CD4 cell count, cell/ $\mu$ L	608.50 (391.75–847.50)	605 (383–803)	608 (424.50–854.75)	.675
CD8 cell count, cell/ $\mu$ L	989.50 (690.25–1446.25)	866 (619.50–1144)	1024.50 (713.50–1574.50)	.053
PI-including regimen	54 (38)	15 (35)	39 (40)	.707
NNRTI-including regimen	53 (31)	20 (47)	33 (34)	.186
INSTI-including regimen	36 (26)	10 (23)	26 (27)	.834
Antihypertensive agents	29 (21)	8 (19)	21 (21)	.822
Hypertension	42 (30)	14 (33)	28 (29)	.691
Dyslipidemia	62 (44)	23 (53)	39 (40)	.144
Lipid-lowering therapy	43 (30)	13 (30)	30 (31)	>.999
Diabetes	43 (30)	1 (10)	42 (31)	.097
Smoking	72 (51)	24 (56)	48 (49)	.471
Ex-smokers	19 (14)	5 (12)	14 (14)	.792
Framingham risk score, median (IQR), %	7 (2–3)	9 (4.25–15)	6 (2–12)	.053
Hepatitis C coinfection	14 (10)	1 (2)	13 (13)	.064
HSV-2 seropositivity	76 (54)	34 (79)	42 (46)	<.001
VZV seropositivity	135 (96)	41 (95)	94 (96)	>.999
Cytomegalovirus seropositivity	128 (91)	41 (95)	87 (89)	.105
hsCRP, mg/mL	2.16 (1.03–4.55)	3.77 (1.34–7.31)	1.89 (0.91–3.94)	.003
Baseline cIMT, mm	0.89 (0.738–1.19)	1 (0.75–1.29)	0.84 (0.70–1.10)	.054
Carotid plaques	40 (28)	14 (33)	26 (27)	.544
Time between measurements, y	1.67 (1.08–2.85)	1.60 (1.04–2.75)	1.70 (1.10–2.92)	.430
Duration of virological suppression, y	4.66 (2.70–6.82)	4.027 (2.61–6.82)	4.791 (3.92–6.48)	.135

Continuous variables are expressed as median (Q1–Q3), unless indicated. Categorical variables are expressed as No. (%).

Abbreviations: cIMT, carotid intima-media thickness; HHV-8, human herpesvirus 8; hsCRP, highly sensitive C-reactive protein; HSV-2, herpes simplex type 2; INSTI, integrase strand transfer inhibitor; IQR, interquartile range; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor; VZV, varicella zoster virus.

and 0.83 [0.70–1.10] mm in HHV-8-uninfected,  $P = .052$ ), and there was no difference in the number of baseline carotid plaques.

The association between HHV-8 and hsCRP was explored after adjustment for the Framingham risk score and for the factors linked with HHV-8 infection in the univariate analysis (Table 2). The results showed that individuals coinfecting with HHV-8 continued to have significantly higher levels of hsCRP in the adjusted model (odds ratio [OR], 1.09; 95% confidence interval [CI], 1.02 to 1.17;  $P = .016$ ). There were no significant differences between HHV-8-infected and -uninfected participants in the baseline cIMT after adjustment.

#### Factors Associated With Progression of Subclinical Atherosclerosis

Median (Q1–Q3) follow-up time per patient was 5.07 (4.38–6.03) years. All patients underwent at least 2 and 108 (76%) underwent 3 or more cIMT examinations, and the median (Q1–Q3) time between cIMT measurements was 1.67 (1.08–2.85) years. There were no significant differences in the cIMT between HHV-8-seropositive and -negative participants after the baseline visit (data not shown). The overall rate of progression of the cIMT at the bulb was +0.027 mm/y, 0.031 in HHV-8-coinfecting and 0.024 in HHV-8-uninfected participants ( $P = .872$ ). Factors associated with cIMT progression in univariate analysis were assessed through a general linear mixed model (Table 3). Results showed that positivity for HHV-8 infection ( $P = .046$ ), for HSV-2 infection (0.049), dyslipidemia ( $P = .024$ ), lipid-lowering therapy ( $P = .015$ ), hypertension ( $P = .035$ ), treatment with antihypertensive agents ( $P = .026$ ), the Framingham risk score ( $P = .005$ ), higher hsCRP levels ( $P = .025$ ), and presence of a carotid plaque ( $P < .001$ ) were associated with faster cIMT progression.

A multivariate model was fitted including seropositivity for HHV-8, HSV-2, CMV, VZV, CD4 cell counts at cIMT measurement, age, the Framingham risk score as a summary variable comprising all cardiovascular risk factors, hepatitis C coinfection, antiretroviral type, and time elapsed between cIMT measurements. The model showed that Framingham risk score ( $P = .057$ ) and coinfection with HHV-8 ( $P = .059$ ) were marginally associated with faster cIMT progression

**Table 2. Adjusted General Linear Binomial Model With Complementary Link Log-Log Function Showing Factors Associated With Human Herpesvirus 8 Infection**

Variable	OR (95% CI)	P Value
hsCRP, mg/mL	1.09 (1.02 to 1.17)	.017
Framingham risk score	1.0 (0.95 to 1.05)	.901
Hepatitis C coinfection	0.26 (0.01 to 1.25)	.188
CD8 cell count, cell/mm <sup>3</sup>	1.0 (1.0 to 1.0)	.132
Baseline cIMT, mm	1.42 (0.70 to 2.68)	.316

Abbreviations: CI, confidence interval; cIMT, carotid intima-media thickness; HHV-8, human herpesvirus 8; hsCRP highly sensitive C-reactive protein; OR, odds ratio.

(Table 4, model A). Another model was constructed adding hsCRP. The model showed that hsCRP ( $P = .031$ ) was associated with higher cIMT progression, but the relationship with HHV-8 seropositivity was much attenuated ( $P = .182$ ) (Table 4, model B). Because of the association found with the 2 herpesviruses in the univariate analysis with cIMT progression, a third model was run adding the variable “coinfection with HHV-8 + HSV-2.” The model showed that HHV-8 + HSV-2 seropositivity ( $P = .028$ ) and Framingham risk score ( $P = .025$ ) were significantly associated with faster cIMT progression (Table 4, model C). Framingham risk score at baseline was the only factor associated with both new developing plaques (adjusted OR, 1.126; 95% CI, 1.05 to 1.20;  $P < .0001$ ) and either new developing plaques or cardiovascular events (adjusted OR, 1.073; 95% CI, 1.01 to 1.14;  $P < .017$ ) during the study period.

## DISCUSSION

Very few studies with a longitudinal design have to date evaluated the role of coinfections in cIMT. We found a relationship of the coinfection with both sexually transmitted herpesviruses HHV-8 and HSV-2, and among them especially with HHV-8, and faster progression of cIMT in virologically suppressed PLWH after adjustment for HIV-related and cardiovascular-related factors, which suggests a potential contributing role to the pathogenesis of atherosclerosis. This effect could be, at least partially, mediated through systemic inflammation, as shown by the higher levels of hsCRP associated with HHV-8 infection and by the mitigation of the effect of the virus on cIMT progression when hsCRP was incorporated into the analysis. The study also showed a strong association of the Framingham risk score with cIMT progression. Framingham risk score was also independently associated with either new developing plaques or cardiovascular events during the study.

Inflammation is considered a central factor in the pathogenesis of atherosclerosis [4, 17]. Infectious agents have been implicated in atherogenesis, both through direct infection of the vessel wall cells, where they cause a local inflammatory response, and through systemic inflammatory reaction mediated by inflammatory cells and cytokines, which could exacerbate the atherogenic processes occurring in the vessel wall [18]. Infection with co-pathogens has also been included among factors contributing to persistent inflammation and immune activation in chronically treated HIV infection and, accordingly, has been implicated in the pathogenesis of non-AIDS events (NAEs), including cardiovascular disease [19]. Although the *Herpesviridae* family represents the most widely explored infectious agents contributing to cardiovascular disease within this population, limited information is available to date about their role in the progression of atherosclerosis.

**Table 3. Univariate General Linear Mixed Model Showing Factors Associated With Progression of Carotid Intima-Media Thickness at the Bulb**

Variable	Coefficient	PValue
CD4 cell count, cell/ $\mu$ L	0.0000163	.850
CD8 cell count, cell/ $\mu$ L	0.0000193	.639
Carotid plaque (cIMT >1.5 mm)	0.3361776	<.001
Lipodystrophy	0.0782997	.224
Hepatitis C coinfection	-0.0045131	.963
Dyslipidemia	0.1743712	.001
Lipid-lowering therapy	0.1677437	.004
Hypertension	0.1130260	.052
Antihypertensive therapy	0.1531224	.016
Smoking	-0.0279689	.616
Previous smokers	-0.0130822	.863
Alcohol	-0.0679639	.449
Framingham risk score, %	0.0131646	.000
hsCRP, mg/mL	0.0086430	.001
HHV-8 seropositivity	0.1526580	.009
HSV-2 seropositivity	0.1103244	.049
VZV seropositivity	-0.0342831	.832
CMV seropositivity	0.0388794	.658
PI-including regimen	0.0521954	.366
INSTI-including regimen	0.0234031	.717

Abbreviations: cIMT, carotid intima-media thickness; CMV, cytomegalovirus; HHV-8, human herpesvirus 8; hsCRP, highly sensitive C-reactive protein; HSV-2, herpes simplex type 2; INSTI, integrase strand transfer inhibitor; PI, protease inhibitor; VZV, varicella zoster virus.

When we longitudinally assessed factors associated with the rate of progression of subclinical atherosclerosis through the cIMT, we found an association of the simultaneous coinfection of HHV-8/HSV-2 with cIMT progression. However, when the independent role of each virus was assessed, we found that only HHV-8 retained a close to significant relationship with the progression of cIMT, and the association of HSV-2 found in univariate analysis vanished. HSV-2 is a sexually transmitted herpesvirus that causes genital herpes. It was associated with subclinical coronary atherosclerosis, measured through coronary artery calcium by computed tomography scan, in a cross-sectional study in PLWH [7]. HHV-8 is also a prevalent sexually transmitted gamma herpesvirus among MSM, especially in those infected with HIV, in whom prevalence twice as high as that in HIV-negative people has been described [20, 21]. Its pro-atherogenic properties in studies in vitro at the vessel wall, and the finding of higher frequency of macroscopic atheromatous lesions in patients with Kaposi's sarcoma in a postmortem report, support the hypothesis of the role of the virus in atherogenesis [12], but to date no clinical studies have associated HHV-8 infection with atherosclerotic disease. Our findings support the role of herpesviruses, as well as the hypothesis of the infectious burden in the pathogenesis of atherosclerosis previously reported [7, 22]. The study analyzed only cIMT progression and factors contributing to a more rapid progression rather than the net effect of HHV-8 and HHV-2 on the evolution of the cIMT. As a consequence, our results might

support the involvement of the viruses in the progression of cIMT but do not implicate that the pathogens alone are associated with atherosclerosis progression in all the infected PLWH.

Interestingly, participants coinfecting with HHV-8 showed higher levels of inflammation measured with hsCRP. Higher levels of hsCRP were likewise associated with faster cIMT progression in our study. This finding might point to systemic inflammation as one of the underlying pathogenic mechanisms participating in atherosclerosis progression in PLWH coinfecting with HHV-8, in addition to the potential viral local effects described on endothelial vascular cells. Such systemic action would explain the attenuation of HHV-8 on cIMT progression when both variables coexisted in the same model. It might have also contributed to explaining the higher levels of baseline cIMT in participants coinfecting with HHV-8, a factor that could also be associated with higher cIMT progression. Both, inflammation and HHV-8 might have contributed to explaining the progression of the cIMT at the carotid bulb, a region where atherosclerosis has previously been described to preferentially progress in PLWH [15]. The carotid bifurcation is a location with low endothelial shear stress, and it has been hypothesized that this could increase vascular susceptibility to the effects of chronic inflammation. Accordingly, and similar to our findings, the cIMT progression at the bulb has been associated with higher hsCRP levels in PLWH [15, 23] and in non-HIV-infected people [24].

Another relevant finding from our study was the strong association of the Framingham risk score with cIMT progression in PLWH, which remained significant throughout all analyses. Our results support the central role that traditional cardiovascular risk factors play in the pathogenesis of atherosclerosis in the HIV population. This reinforces the importance of prioritizing strict control of cardiovascular risk factors among the measures necessary to decrease the incidence of cardiovascular disease in PLWH.

The study has some limitations. First, it focused on cIMT progression, and therefore results cannot be extrapolated to all HHV-8-coinfecting individuals. Second, most covariates, excluding CD4 cell counts and HIV-RNA levels, were only measured at baseline, and changes might have occurred throughout the study period. We could not rule out new HHV-8 coinfections during follow-up in those who were initially seronegative. However, according to previous epidemiological studies, the risk of seroconversion would have been very low (1.4 per 1000 susceptible persons) [25] and unlikely to impact the results. The population included in the study represents a pool of participants from a high-income country, and then the generalizability of results could be uncertain in low-income countries like sub-Saharan Africa. Finally, although a strong association between cIMT and CVD events has been established, the association between individual cIMT progression and future CVD events remains unproven [26, 27]. The strengths are the

**Table 4. Multivariate-Adjusted General Linear Mixed Model Showing Factors Associated With Progression of Carotid Intima-Media Thickness at the Bulb**

Model	Variable	Coefficient	(95% CI)	P Value
A	Time, y	0.0338	(−0.0089 to 0.0765)	.118
	Framinghamrisk score, %	0.0090	(−0.0003 to 0.0183)	.057
	CD4 cell count, cell/mm <sup>3</sup>	0.0014	(−0.0077 to 0.0106)	.758
	Age, y	0.0045	(−0.0003 to 0.0094)	.066
	HHV-8 seropositivity	0.1252	(−0.0048 to 0.2551)	.059
	HSV-2 seropositivity	−0.0270	(−0.1626 to 0.1086)	.693
	VZV seropositivity	−0.0942	(−0.4309 to 0.2424)	.579
	CMV seropositivity	−0.0352	(−0.2369 to 0.1664)	.729
	Hepatitis C coinfection	0.0376	(−0.2061 to 0.2813)	.760
	PI-including regimen	0.0290	(−0.0907 to 0.1487)	.632
	INSTI-including regimen	0.0003	(−0.1329 to 0.1336)	.996
B	Time, y	0.0359	(−0.0063 to 0.0782)	.094
	Framinghamrisk score, %	0.0080	(−0.0011 to 0.0170)	.084
	CD4 cell count, cell/mm <sup>3</sup>	0.0010	(−0.0080 to 0.0100)	.825
	Age, y	0.0044	(−0.0003 to 0.0091)	.068
	hsCRP, mg/mL	0.0063	(0.0007 to 0.0119)	.027
	HHV-8 seropositivity	0.0869	(−0.0437 to 0.2176)	.189
	HSV-2 seropositivity	−0.0340	(−0.1660 to 0.0890)	.611
	VZV seropositivity	−0.0719	(−0.4014 to 0.2575)	.666
	CMV seropositivity	−0.0140	(−0.2120 to 0.1840)	.889
	Hepatitis C coinfection	0.040	(−0.1970 to 0.2784)	.735
	PI-including regimen	0.0218	(−0.0950 to 0.1385)	.712
INSTI-including regimen	0.0041	(−0.1256 to 0.1338)	.950	
C	Time, y	0.0297	(−0.0122 to 0.0720)	.166
	Framinghamrisk score, %	0.0097	(0.0007 to 0.0187)	.035
	CD4 cell count, cell/mm <sup>3</sup>	0.0010	(−0.0080 to 0.0100)	.826
	Age, y	0.0048	(0.0001 to 0.0096)	.046
	HHV-8 seropositivity	−0.1156	(−0.3616 to 0.1304)	.354
	HSV-2 seropositivity	−0.1151	(−0.2680 to 0.0379)	.139
	HSV-2 + HHV-8 seropositivity	0.3230	(0.0330 to 0.6076)	.027
	VZV seropositivity	−0.0552	(−0.3851 to 0.2747)	.741
	CMV seropositivity	−0.0436	(−0.2408 to 0.1535)	.661
	Hepatitis C coinfection	−0.0034	(−0.2429 to 0.2362)	.978
	PI-including regimen	0.0122	(−0.1049 to 0.1294)	.836
INSTI-including regimen	0.0395	(−0.0940 to 0.1729)	.559	

Time denotes number of years between cIMT measures.

Abbreviations: cIMT, carotid intima-media thickness; CMV, cytomegalovirus; HHV-8, human herpesvirus 8; hsCRP, highly sensitive C-reactive protein; HSV-2, herpes simplex type 2; INSTI, integrase strand transfer inhibitor; PI, protease inhibitor; VZV, varicella zoster virus.

longitudinal nature of the study, which allows a more accurate assessment of the role of an infectious agent in the course of atherosclerosis than that offered by cross-sectional studies, and the consistency of the results obtained, as shown by the strong association of the Framingham risk score with cIMT progression.

In conclusion, among virologically suppressed PLWH, HHV-8 and HHV-8-induced systemic inflammation could contribute to faster progression of cIMT, and this potential effect would be more evident when coinfection with HSV-2 occurs. Our results also confirm that traditional cardiovascular risk factors have a prominent role in the pathogenesis of atherosclerosis within this population, and preventive actions should maximize efforts to achieve their optimal control.

### Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Open Forum Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

### Acknowledgments

**Financial support.** This work was supported by Instituto de Salud Carlos III (PI08/893, PI13/02256, PI16/01740), Instituto de Salud Carlos III (INT 14/00207), Instituto de Salud Carlos III (CM15/00187), and Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO UGP-14-197 and Contrato Predoctoral FISABIO 2015 UGP-15-152).

**Potential conflicts of interest.** All authors: no reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of

Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

**Presentation of data.** Accepted for a poster presentation at the 2019 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), ID 3109.

## References

1. Palella FJ Jr, Baker RK, Moorman AC, et al; HIV Outpatient Study Investigators. Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2006**; 43:27–34.
2. Boccard F, Lang S, Meuleman C, et al. HIV and coronary heart disease: time for a better understanding. *J Am Coll Cardiol* **2013**; 61:511–23.
3. Hemkens LG, Bucher HC. HIV infection and cardiovascular disease. *Eur Heart J* **2014**; 35:1373–81.
4. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* **1999**; 340:115–26.
5. French MA, King MS, Tschampa JM, et al. Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4+ T cells. *J Infect Dis* **2009**; 200:1212–5.
6. Ibrahim AI, Obeid MT, Jouma MJ, et al. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in atherosclerotic plaques and in unaffected bypass grafts. *J Clin Virol* **2005**; 32:29–32.
7. Hechter RC, Budoff M, Hodis HN, et al. Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) as a coronary atherosclerosis risk factor in HIV-infected men: multicenter AIDS cohort study. *Atherosclerosis* **2012**; 223:433–6.
8. 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**; 20:2275–83.
9. Masiá M, Robledano C, Ortiz de la Tabla V, et al. Increased carotid intima-media thickness associated with antibody responses to varicella-zoster virus and cytomegalovirus in HIV-infected patients. *PLoS One* **2013**; 8:e64327.
10. Sacre K, Hunt PW, Hsue PY, et al. A role for cytomegalovirus-specific CD4+CX3CR1+ T cells and cytomegalovirus-induced T-cell immunopathology in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS* **2012**; 26:805–14.
11. Gutiérrez F, Masiá M, Padilla S, et al. Occult lymphadenopathic Kaposi's sarcoma associated with severe pulmonary hypertension: a clinical hint about the potential role of HHV-8 in HIV-related pulmonary hypertension? *J Clin Virol* **2006**; 37:79–82.
12. Grahame-Clarke C, Alber DG, Lucas SB, et al. Association between Kaposi's sarcoma and atherosclerosis: implications for gammaherpesviruses and vascular disease. *AIDS* **2001**; 15:1902–4.
13. Masiá M, Robledano C, Ortiz de la Tabla V, et al. Coinfection with human herpesvirus 8 is associated with persistent inflammation and immune activation in virologically suppressed HIV-infected patients. *PLoS One* **2014**; 9:e105442.
14. Hsue PY, Lo JC, Franklin A, et al. Progression of atherosclerosis as assessed by carotid intima-media thickness in patients with HIV infection. *Circulation* **2004**; 109:1603–8.
15. Hsue PY, Scherzer R, Hunt PW, et al. Carotid intima-media thickness progression in HIV-infected adults occurs preferentially at the carotid bifurcation and is predicted by inflammation. *J Am Heart Assoc* **2012**; 1:jah3-e0004.
16. Lichtenstein KA, Armon C, Buchacz K, et al; HIV Outpatient Study (HOPS) Investigators. Low CD4+ T cell count is a risk factor for cardiovascular disease events in the HIV outpatient study. *Clin Infect Dis* **2010**; 51:435–47.
17. Anderson JL, Carlquist JF, Muhlestein JB, et al. Evaluation of C-reactive protein, an inflammatory marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **1998**; 32:35–41.
18. Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, et al. Effects of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-reactive protein levels. *Am J Cardiol* **2000**; 85:140–6.
19. Boulougoura A, Sereti I. HIV infection and immune activation: the role of coinfections. *Curr Opin HIV AIDS* **2016**; 11:191–200.
20. Casper C, Meier AS, Wald A, et al. Human herpesvirus 8 infection among adolescents in the REACH cohort. *Arch Pediatr Adolesc Med* **2006**; 160:937–42.
21. Renwick N, Halaby T, Weverling GJ, et al. Seroconversion for human herpesvirus 8 during HIV infection is highly predictive of Kaposi's sarcoma. *AIDS* **1998**; 12:2481–8.
22. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, et al. Impact of infectious burden on progression of carotid atherosclerosis. *Stroke* **2002**; 33:2581–6.
23. Hileman CO, Longenecker CT, Carman TL, McCormsey GA. C-reactive protein predicts 96-week carotid intima media thickness progression in HIV-infected adults naive to antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2014**; 65:340–4.
24. Toprak A, Kandavar R, Toprak D, et al. C-reactive protein is an independent predictor for carotid artery intima-media thickness progression in asymptomatic younger adults (from the Bogalusa Heart Study). *BMC Cardiovasc Disord* **2011**; 11:78.
25. Melbye M, Cook PM, Hjalgrim H, et al. Risk factors for Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) seropositivity in a cohort of homosexual men, 1981–1996. *Int J Cancer* **1998**; 77:543–8.
26. Lorenz MW, Polak JF, Kavousi M, et al; PROG-IMT Study Group. Carotid intima-media thickness progression to predict cardiovascular events in the general population (the PROG-IMT collaborative project): a meta-analysis of individual participant data. *Lancet* **2012**; 379:2053–62.
27. Kokubo Y, Watanabe M, Higashiyama A, et al. Impact of intima-media thickness progression in the common carotid arteries on the risk of incident cardiovascular disease in the suita study. *J Am Heart Assoc* **2018**; 7:e007720.