

Departamento de Medicina
Universidad Autónoma de Barcelona

**ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN LIPOPROTEICA Y MARCADORES DE
INFLAMACIÓN EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

Sílvia Paredes González-Albo

Tesis doctoral 2004

Lluís Masana Marín, catedràtic de Medicina de la Facultat de Medicina i Ciències de la salut de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFICA:

Que Sílvia Paredes González-Albo ha realitzat sota la meva direcció la tesi doctoral titulada: **Estudio de la oxidación lipoproteica y marcadores de inflamación en pacientes con artritis reumatoide** i que està en condicions de ser presentada per a l'obtenció del grau de doctor.

Per a que així consti es signa la present a Reus, 30 de desembre del 2003

Prof. Lluís Masana Marín

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luís Masana Marín, por haber sido incentivo, estímulo y guía en la realización de esta tesis

A la Dra. Josefa Girona Tell, con quien compartí objetivos, trabajo y amistad; por su disponibilidad y ayuda inestimable en las diferentes tareas realizadas

Al Dr. Pere Benito y al Servicio de Reumatología del Hospital del Mar y de la Esperanza, por el apoyo y confianza que depositaron en mí

A Merche Heras y Silvia Olivé, por su colaboración en las arduas tareas de laboratorio

A todos los compañeros de la Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi por su amistad y apoyo que hizo posible superar cualquier dificultad con renovados ánimos y optimismo

Y a mi familia, por su apoyo incondicional y por haber sabido inculcarme el valor del esfuerzo y la constancia

A Carlos, Dídac, Roger; y a mis padres

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ARTRITIS REUMATOIDE: MORTALIDAD Y CAUSAS DE MUERTE	2
1.1.1. Mortalidad en pacientes con artritis reumatoide	3
1.1.2. Factores pronósticos asociados a la elevada mortalidad	4
1.1.3. Causas de muerte en pacientes con artritis reumatoide	6
1.1.3.1. Mortalidad por causas ajenas a enfermedad cardiovascular	7
1.2. ARTRITIS REUMATOIDE Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	
1.2.1. Morbilidad atribuible a enfermedad cardiovascular	9
1.2.2. Mortalidad por enfermedad cardiovascular	10
1.2.3. Vasculitis coronaria	11
1.3. ALTERACIONES LIPÍDICAS Y OTROS FACTORES DE RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE	
1.3.1. Lipoproteínas	12
1.3.2. Peroxidación lipídica y antioxidantes	15
1.3.3. Homocisteína	17
1.3.4. Tabaquismo	17
1.3.5. Hipertensión arterial	18
1.3.6. Diabetes <i>Mellitus</i>	19
1.3.7. Otros factores de riesgo	19
1.4. ATEROMA, LÍPIDOS Y MATRIZ EXTRACELULAR	
1.4.1. Patogenia de la aterosclerosis	20
1.4.2. Placa inestable	21
1.4.3. Función de la matriz extracelular	22
1.4.3.1. Proteoglicanos de la matriz extracelular	23
1.4.3.2. Afinidad de las LDL densa y pequeñas por los proteoglicanos	26
1.5. ATEROMA Y OXIDACIÓN LIPÍDICA	27
1.5.1. Mecanismos implicados en la oxidación lipídica	28

1.5.2. Peroxidación lipídica	29
1.5.3. Cinética de la oxidación lipídica de lipoproteínas	31
1.5.4. Efectos biológicos de las lipoproteínas oxidadas	33
1.5.5. Productos derivados de la oxidación lipídica	33
1.5.6. Vitaminas antioxidantes	39
1.6. INFLAMACIÓN Y ATEROMA: RELACIÓN CON LA FOSFOLIPASA A2 SECRETORA (sPLA2)	41
1.6.1. sPLA2 y artritis reumatoide	42
1.6.2. sPLA2 y Ateroma	43
1.7. INFLAMACIÓN Y ATEROMA EN LA ARTRITIS REUMATOIDE	
1.7.1. Artritis reumatoide y membrana sinovial	45
1.7.2. Artritis reumatoide y ateromatosis	47
1.7.3. Marcadores de inflamación y ateromatosis	48
1.7.3.1. Proteína C reactiva	48
1.7.3.2. Factor de necrosis tumoral- α	50
1.7.3.3. Moléculas de adhesión	52
1.7.3.4. Interferon gamma	54
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	56
2.1. HIPÓTESIS	57
2.2. OBJETIVOS	57
3. PACIENTES Y MÉTODOS	58
3.1. PACIENTES	59
3.1.1. Pacientes con artritis reumatoide	59
3.1.2. Evaluación de la actividad de la enfermedad	
3.1.3. Población de referencia	60
3.1.4. Estudio clínico	60

3.2. MÉTODOS DE LABORATORIO	61
3.2.1. Perfil lipídico y subfracciones lipoproteicas	62
3.2.2. Estudio de la oxidación lipídica	63
3.2.2.1. Oxidación de las LDL	63
3.2.2.2. Determinación de vitamina E	65
3.2.2.3. Determinación de vitamina A	
3.2.3. Interacción entre las LDL y el condroitín-6-sulfato	67
3.2.4. Marcadores de inflamación	68
3.3. ESTADÍSTICA	70
4. RESULTADOS	71
4.1. Revisión: Mortalidad global y por enfermedad cardiovascular	73
4.2. Elevated levels of small, low-density lipoprotein with high affinity for arterial matrix components in patients with rheumatoid arthritis. Possible contribution of phospholipase A2 to this atherogenic profile.	83
4.3. Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis: Association with inflammatory markers.	90
5. DISCUSIÓN	97
6. CONCLUSIONES	103
7. BIBLIOGRAFÍA	105

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Artritis reumatoide: mortalidad y causas de muerte

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica caracterizada por la afectación inflamatoria crónica de la membrana sinovial de las articulaciones. Existe suficiente evidencia para considerar esta enfermedad como un proceso autoinmune en el que una respuesta inmunológica dirigida predominantemente frente a la membrana sinovial da lugar a una reacción inflamatoria que se perpetúa y provoca la destrucción secundaria del cartílago y huesos articulares. No se conoce la causa o causas exactas de la AR, sin embargo, parece que el origen de la enfermedad es multifactorial, aceptándose factores iniciadores, probablemente infecciosos, que actúan sobre individuos genéticamente predispuestos ¹.

La AR afecta al 0.5 % de la población española y aproximadamente el 1% de la población norteamericana entre los 20 y 80 años. La frecuencia de la enfermedad aumenta con la edad, y predomina en el sexo femenino en una proporción aproximada de 3:1 ^{2,3}. Aunque la enfermedad presenta diferentes patrones o modelos de historia natural, la mayoría de los pacientes padecen un curso crónico y progresivo. La incapacidad funcional, la inmovilidad prolongada, los tratamientos empleados o el estado inflamatorio de la enfermedad ocasionan una importante morbilidad y un elevado coste socio-económico.

En la actualidad, está bien establecido el hecho de que la AR reduce no sólo la calidad de vida sino también la cantidad de vida. Un gran número de estudios poblacionales han demostrado que la AR conduce a una mortalidad prematura. Hemos revisado estos estudios y las causas de muerte en pacientes con AR, así como los factores que se han asociado a una mayor mortalidad.

1.1.1. Mortalidad en pacientes con artritis reumatoide

El primer estudio de mortalidad en AR fue publicado por Cobb et al. En este estudio, se siguieron, durante una media de 9,6 años, 583 pacientes con AR. La tasa de mortalidad de los pacientes con AR fue de 24,4 muertes por 1000 pacientes por año comparado con un número esperado de 18,9⁵. En numerosos estudios posteriores se han estudiado la mortalidad en la AR. La mayoría de estos estudios han demostrado consistentemente un incremento en la mortalidad de los pacientes con AR cuando se compara con las tasas esperadas en la población general. La mayor parte de estos estudios son de tipo cohortes y prospectivos. El periodo de seguimiento varía entre 3 y 35 años. La medida más utilizada para cuantificar el impacto de la mortalidad de los pacientes con AR fue la tasa de mortalidad estandarizada (TMS, descrita como la relación entre el número de muertes observadas en sujetos con AR en un periodo de tiempo y el número de muertes observadas en la población general en el mismo periodo). Las proporciones de TMS oscilan entre 1,3 y 3⁶⁻²⁶. La esperanza de vida en la AR está significativamente reducida entre tres y diez años según diferentes estudios^{9,15,18,26}.

Estudios más recientes continúan confirmando este aumento de mortalidad. Riise y Chehata et al. encontraron una TMS de 2 y de 1.65 respectivamente^{27,28}. Yelin et al. observaron 270 muertes en 1269 pacientes afectados de AR con un exceso de mortalidad de 39%²⁹. Gabriel et al. encontraron una supervivencia disminuida en pacientes con AR en comparación con la población general con una TMS 1.27. El periodo de seguimiento fue de 40 años³⁰. Martínez et al. observaron una TMS de 1.85 en un estudio realizado en Madrid, en 182 pacientes con AR, con un seguimiento de 9 años³¹.

Por el contrario, son muy pocos los estudios en los que no se describe un aumento de mortalidad en pacientes con AR. Linos et al., en un estudio de incidencia y prevalencia de AR, no encontraron diferencias de mortalidad en estos pacientes en comparación con la población general ³². En dicho estudio incluyeron pacientes con AR clásica, definida y probable. Lindqvist et al. estudiaron individuos con AR de muy reciente inicio sin que observaran un aumento de mortalidad a lo largo de 8 años de seguimiento ³³.

Parece estar muy claro que la AR no sólo influye en el estado funcional y en la calidad de vida, sino que también reduce significativamente la esperanza de vida.

En cuanto a la evolución de la mortalidad en la AR en el transcurso del tiempo, a pesar de sugerencias en el sentido contrario ³³, puede concretarse que el exceso de mortalidad de la AR no ha cambiado en cuatro décadas ³⁴. Es decir, que mientras que en la población general la tasa de mortalidad ha ido disminuyendo y la expectativa de vida ha ido aumentando, en la AR no ha habido un beneficio paralelo.

1.1.2. Factores pronósticos asociados a la elevada mortalidad descrita en pacientes con artritis reumatoide

La elevada mortalidad descrita en pacientes con AR ha llevado al estudio de los factores pronósticos.

Los factores que en la mayoría de los estudios se han relacionado con mayor mortalidad son: la edad avanzada, el sexo masculino y la discapacidad funcional

5,12,18,19,20,21,22,25,29,35-45

Otros factores ampliamente estudiados que se han correlacionado positivamente con el incremento de tasa de mortalidad en pacientes con AR han sido la duración de la enfermedad ^{5,18,26,40} y el factor reumatoide ^{5,18,21,22, 37}.

La inflamación propia de la enfermedad, medida a través de parámetros analíticos (proteína C reactiva (PCR), velocidad de sedimentación globular (VSG)) ^{5,18,22,42} y el número de articulaciones inflamadas ^{18,22,38} se han asociado a un incremento de mortalidad.

Los pacientes con AR con manifestaciones extraarticulares presentan un incremento de mortalidad muy superior a la población general y a los individuos con AR sin manifestaciones extraarticulares. La neuropatía, la vasculitis cutánea, el síndrome de Felty, la pleuritis y la pericarditis son las que se han asociado a un exceso de mortalidad mayor y en menor medida los nódulos reumatoides ^{18,22,43}.

En cuanto a los tratamientos empleados en la AR, la utilización de glucocorticoides no parece influir en la mortalidad según algunos autores ^{12,18,21,25,44}, aunque existen estudios que encontraron una mayor mortalidad en pacientes tratados con estos fármacos ^{22,36}. Otros autores han relacionado el uso de fármacos inductores de remisión de la AR en general ^{25,42}, sales de oro ³⁷ y penicilamina ³⁶ con una menor mortalidad. En un estudio reciente se ha visto como la respuesta al tratamiento con metotrexato reducía significativamente la tasa de mortalidad en pacientes con AR activa y agresiva. La dosis de metotrexato empleadas fueron de 15-20 mg/semana y, tras un seguimiento medio de 10 años, observaron que los pacientes con una respuesta ACR superior al 50% tenían una TMS de 1,47, el grupo de pacientes con una respuesta ACR de 20-50% tenían una TMS de 1.85 y los pacientes que no respondieron al tratamiento presentaron un incremento de mortalidad muy

importante con una TMS de 4,1⁴⁵. Previamente, otros autores también observaron una menor mortalidad en pacientes tratados con metotrexato⁴⁶.

La hipertensión arterial ha sido la comorbilidad más estudiada, observándose una mortalidad mayor en pacientes hipertensos con AR^{22,25,35,42}. La patología cardiovascular concomitante, también se ha asociado a incremento de mortalidad^{25,42}. En cambio, la diabetes *mellitus* no se ha asociado, en estos pacientes, a un mayor riesgo de muerte²⁵.

Otros factores pronósticos menos estudiados con correlación positiva con la elevada mortalidad han sido la fuerza de presión¹⁹, HLA-B27³⁶, proteinuria^{19,20}; con correlación negativa el nivel educacional elevado^{21,30,32,36}, el tratamiento hormonal sustitutivo²³ y sin correlación, el HLA-DR4^{23,36} y HLA-B27²³, la hemoglobina^{2,13} y la raza²⁹.

1.1.3. Causas de muerte en pacientes con artritis reumatoide

La enfermedad cardiovascular (ECV) es considerada como la principal causa de mortalidad en la AR, siendo responsable de aproximadamente la mitad de todas las muertes. Además, la mayoría de estudios encuentran un incremento de mortalidad por esta causa en comparación con la población general. Las infecciones y la patología gastrointestinal son otras causas de muerte más frecuentes en pacientes con AR que en la población general. Un aspecto que dificulta la comparación entre estudios y que puede justificar las diferencias halladas de los porcentajes atribuibles a diferentes causas de muerte lo constituye el hecho de que no todos los autores clasifican igual las causas de muerte. Ejemplos de estas diferencias de clasificación

son las neumonías (clasificadas por algunos autores como enfermedades respiratorias y por otros como infecciones) y la amiloidosis renal (puede clasificarse como causa genito-urinaria o como complicación de la AR). Las complicaciones por el tratamiento son igualmente clasificadas de forma diferentes por los distintos autores. La mayoría de los autores no identifican las complicaciones gastrointestinales y las infecciones como complicaciones de la AR o del tratamiento de ésta.

1.1.3.1. Mortalidad por causas ajenas a enfermedad cardiovascular en pacientes con AR

Entre las causas de mortalidad diferentes a ECV destacan, por su incidencia, las infecciones, neoplasias y causas directamente relacionadas con complicaciones o tratamientos de la propia AR.

Las infecciones son responsables de un 10 a 27% de los fallecimientos según diferentes estudios ^{16,18,19,22}. La sepsis y la infección de origen pulmonar parecen ser las causas principales de infección en la mayoría de los estudios ^{9,15,16,18,22,26}. La razón de la mayor susceptibilidad a las infecciones en la AR no se conoce, aunque se ha relacionado con un defecto primario del sistema inmunológico, al igual que ocurre en otras enfermedades crónicas ^{15,16}. El tratamiento con inmunosupresores y corticoides parece tener un papel importante en el incremento del número de infecciones en pacientes con AR por disminución de la capacidad defensiva inmunológica ^{12,47}.

Las neoplasias suponen entre 11 y 20% de causas de muertes en pacientes con AR ^{15,19,22,24}. Algunos autores encuentran una menor mortalidad por neoplasia en pacientes con AR ^{10,11}. Otros estudios no evidencian diferencias significativas en comparación con la población control ^{48,49,50} y otros autores muestran una mayor mortalidad de la esperada ⁵¹.

Los resultados contradictorios obtenidos en los diferentes estudios no permiten extraer conclusiones definitivas respecto a la incidencia de muerte por neoplasia en pacientes con AR, aunque algunos estudios han encontrado un aumento de riesgo de enfermedades linfoproliferativas malignas, principalmente linfoma Hodgkin y no-Hodgkin, leucemia y mieloma. Estas neoplasias se han relacionado con la duración de la enfermedad, con el tratamiento inmunosupresor y con el uso de fármacos citotóxicos ^{50,52,53}.

El porcentaje de causas de muerte atribuibles a la AR ya sea por complicaciones de la enfermedad o por el tratamiento varía de unos estudios a otros oscilando entre un 5 y 20% ^{14,19,23}. Las causas principales de muerte descritas en este sentido han sido amiloidosis, vasculitis y compresión medular por subluxación atlas-axis ^{18,20}. De éstas, la amiloidosis es la más frecuente, oscilando entre un 3 y un 12% de las causas de muerte ^{5,16,20}.

La mortalidad por enfermedad gastrointestinal por ulcus o perforación en la AR representa entre un 3 y 7% según los distintos estudios. La razón de este exceso de mortalidad por complicaciones gastrointestinales se asocia principalmente al uso crónico de antiinflamatorios no esteroideos ⁴⁷.

1.2. Artritis reumatoide y enfermedad cardiovascular

1.2.1. Morbilidad atribuible a enfermedad cardiovascular

En un estudio cohorte retrospectivo se observó que de los 211 pacientes con AR seropositiva incluidos, 75 presentaron un accidente cardiovascular durante el periodo de seguimiento de 17 a 21 años. Sesenta y nueve de éstos era el primer episodio mortal o no mortal que presentaban tras iniciar la AR. De estos episodios, el más frecuente fue la cardiopatía isquémica (CI) en 35 pacientes con 9 casos mortales, accidente cerebrovascular en 26 pacientes (6 mortales), trombosis venosa y tromboembolismo pulmonar en 8 pacientes (no mortales) ⁴².

En otro trabajo realizado la prevalencia de CI en 71 pacientes con AR sin ECV conocida fue de un 50% cuando se realizaba estudio combinado con ECG y mediante la valoración de la perfusión del miocardio con Talio 201, a través de tomografía computadorizada, utilizando la prueba de estrés con adenosina (SPECT). La evidencia de CI no se asoció a la edad, sexo, duración de la enfermedad ni a la administración de glucocorticoides ⁵⁴.

Otros autores han evidenciado en pacientes con AR sin ECV conocida anomalías en la función cardíaca, caracterizada por una función diastólica disminuida del ventrículo izquierdo en comparación con un grupo control de individuos sanos ^{55,56}.

Un estudio más reciente continúa confirmando esta elevada morbilidad por ECV en pacientes con AR. En este trabajo observaron que las mujeres con AR tienen el doble de riesgo de sufrir un infarto agudo de miocardio (IAM) en comparación con

mujeres sin la enfermedad. Esta asociación entre AR e IAM se mantenía independientemente de otros factores de riesgo de enfermedad coronaria ⁵⁷.

1.2.2. Mortalidad por enfermedad cardiovascular

La ECV es la principal causa de muerte en pacientes con AR. Además, en un gran número de estudios se ha descrito un exceso de muerte por esta causa con respecto a la población general. Así, algunos autores observaron que la principal causa de muerte en pacientes con AR era la ECV con una TMS de 2,26 y para los accidentes cerebrovasculares de 2,4 ²². En otros estudios, también encontraron como principal causa de muerte los accidentes cardiovasculares con una TMS de 1,77 respecto a los individuos sin AR ²¹. Posteriormente, en un estudio cohorte que incluyó a 1.186 mujeres diagnosticadas de AR, observaron que la muerte por ECV ocurría en el 50% de las mujeres, con una TMS de 1,34 respecto a la población general. La CI fue la causa principal de muerte por ECV con una TMS de 1,51 ²⁴. Otros autores encontraron que la causa más frecuente de muerte era por ECV con un 53% de casos, y de éstas la más frecuente era por CI con un 30%. Esto se correspondía con una mayor mortalidad de la esperada para ECV, con una TMS para la mujer de 1,54 y para el hombre de 1,36. La CI en la mujer representaba una TMS de 1,68 y en hombre 1,41. En cuanto a las muertes por accidente cerebrovascular no observaron diferencias significativas con respecto a la población general ²⁵. En un estudio más reciente observaron al igual que en los anteriores, un exceso de mortalidad del 34% para ECV en ambos sexos tanto en los pacientes con AR de inicio como en los pacientes con AR de larga evolución. El porcentaje de

exceso de muerte por esta causa no se veía afectado por el tiempo de evolución de la enfermedad. Los autores relacionaban el exceso de mortalidad con padecer la AR más que con el efecto acumulativo de la enfermedad o del tratamiento empleado, y sugirieron que la AR puede considerarse un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular ²⁶.

1.2.3. Vasculitis coronaria

La razón de esta elevada mortalidad cardiovascular en pacientes con AR continúa en la actualidad siendo un enigma. Se ha cuestionado como posible causa la vasculitis subclínica. En pacientes con AR se han observado afectación de arterias coronarias en autopsias. En un estudio se encontró 17 vasculitis sistémicas en una serie de 173 autopsias de pacientes con AR, en cuatro de las cuales había afectación de las arterias coronarias ⁵⁸. En otro estudio clínico-patológico de 81 autopsias en pacientes con AR encontraron 14 fallecimientos por enfermedad cardiaca. Los hallazgos patológicos encontrados incluyeron: pericarditis, miocarditis, angiitis, microinfartos, lesiones granulomatosas y depósitos de amiloide ³⁹. Otro autor sobre un total de 102 pacientes con AR a lo largo de 4 años detectó seis pacientes con vasculitis sistémicas, dos de los cuales presentaron IAM, aunque solamente en un caso se confirmó mediante autopsia vasculitis coronaria. Se concluyó que la vasculitis no es una causa frecuente de IAM ⁵⁹. Otros autores han publicado casos aislados de IAM por vasculitis coronaria como complicación poco frecuente de la AR ^{60,61,62}.

En conjunto, la experiencia publicada sobre vasculitis se limita a pocos pacientes. Por todo ello, se hace difícil poder extraer conclusiones en cuanto a la asociación de vasculitis y elevada afectación cardiovascular en pacientes con AR.

1.3. Alteraciones lipídicas y otros factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en pacientes con AR

1.3.1. Lipoproteínas

Varios estudios han observado en pacientes con AR y otras poliartritis crónica activas alteraciones del perfil lipídico en comparación con un grupo control sano ^{63,64}. Estas alteraciones se caracterizaban por concentraciones disminuidas de colesterol en todas las fracciones lipoproteicas (lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL)); y concentraciones disminuidas de triglicéridos en las VLDL y en las subfracciones de las HDL. Estudios posteriores, observaron la normalización de los trastornos lipídicos, al conseguir reducir la actividad inflamatoria de la enfermedad durante el tratamiento combinado con glucocorticoides y fármacos inductores de remisión ^{65,66}. Más recientemente, otros autores encontraron en pacientes con AR sin tratamiento con glucocorticoides o fármacos inductores de remisión, niveles de apoA-1 y colesterol-HDL más bajos, con un ratio apoB/apoA-1 más alto en comparación con un grupo control. La PCR en pacientes con AR se correlacionó inversamente con la apoA-1 ⁶⁷.

Las bajas concentraciones encontradas de HDL se han asociado a un mayor riesgo de aterosclerosis, aunque la disminución concomitante de LDL hace que este perfil de lipoproteínas cuantitativamente no comporte un mayor riesgo de aterogénesis en pacientes con AR.

Las alteraciones cualitativas del perfil lipídico no han sido estudiadas en pacientes con AR, en cambio, en pacientes con artritis crónica juvenil (ACJ) se han descrito alteraciones cualitativas en relación con la actividad inflamatoria de la enfermedad. Estas alteraciones se caracterizaban por un descenso de los niveles de HDL2 y HDL3 asociadas a una disminución de la actividad de la enzima acetilhidrolasa del factor de activación plaquetario (PAF-AH). Los niveles de HDL2 y HDL3 se correlacionaron inversamente con los niveles en plasma de PCR. La PAF-AH es un enzima que actúa sobre los fosfolípidos de las LDL y HDL e hidroliza e inactiva el factor de activación plaquetario (PAF), potente mediador de la inflamación. En este estudio los niveles de actividad de PAF-AH asociadas a LDL densas fueron significativamente más bajos en pacientes con ACJ activa que en pacientes con ACJ inactiva y el grupo control ⁶⁸.

Se ha sugerido que la PAF-AH puede inhibir la oxidación de las LDL y disminuir la actividad biológica de las LDL oxidadas con un papel antiaterogénico. Este estudio muestra alteraciones cualitativas del perfil lipídico que podrían contribuir a una mayor aterogénesis en relación con la actividad inflamatoria en pacientes con ACJ.

La Lipoproteína (a) (Lp(a)) es una lipoproteína rica en colesterol que está compuesta por una partícula de LDL unida covalentemente vía un puente -s-s- entre la apoB y una proteína que no es una lipoproteína, la apo (a). La Lp(a) tiene un

metabolismo distinto a las LDL y números estudios sugieren que es un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular independiente de edad, sexo, dieta y de tratamientos hipolipemiantes. La elevada asociación encontrada en muchos estudios entre niveles elevados de Lp(a) y aterosclerosis indica que la Lp(a) es un factor de gran importancia en la patogénesis de la aterosclerosis, lo cual se asocia con un aumento de morbimortalidad cardiovascular. La concentración de Lp(a) es muy variable entre las personas y depende principalmente de factores genéticos que condicionan el tamaño de la molécula de apo (a) ⁶⁹.

En pacientes con AR se ha observado un aumento de Lp(a), con resultados contradictorios cuando se correlacionaban parámetros de inflamación con niveles de Lp(a). Algunos autores encontraron una correlación positiva con la VSG y recuento de plaquetas ⁷⁰. Otros, en cambio, no encontraron relación entre los niveles de Lp(a) y la VSG o la PCR ^{67,71}. Además, cuando estudiaron el fenotipo de la apo(a) encontraron diferencias entre pacientes con AR y el grupo control. El fenotipo S3 se encontró en un 70% de los pacientes con AR versus un 39% de los controles.⁷¹ En pacientes con AR no se encontró relación entre el fenotipo S3 y el HLA DR4. El HLA DR4 se ha relacionado con la etiología y con la severidad de la AR ⁷².

En pacientes con AR distintas citocinas, entre ellas la interleuquina-6 (IL-6), juegan un papel fundamental en el proceso inflamatorio e inmunológico de la enfermedad. La síntesis hepática de Lp(a) podría verse estimulada por citocinas, principalmente la IL-6, dando lugar a un aumento de la concentración de Lp(a) ⁷³.

1.3.2. Peroxidación lipídica y antioxidantes

Existe evidencia de que los radicales libres que inician la peroxidación lipídica juegan un papel importante en la actividad inflamatoria de la AR. Los neutrófilos, linfocitos y macrófagos aparecen en cantidades importantes en el espacio articular. La actividad de estas células, principalmente macrófagos, producen compuestos, incluyendo radicales libres, capaces de iniciar la peroxidación lipídica en los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de membrana celulares dañándolas. En la membrana sinovial de pacientes con AR se han encontrado concentraciones elevadas de peróxidos lipídicos, lo cual confirma que en la AR existe un aumento de la peroxidación lipídica. Este aumento de la peroxidación lipídica se ha observado tanto en el líquido sinovial como en el plasma de estos pacientes ⁷⁴. El 4 hidroxil-2 noenal (4-HNE) que es un aldehído citotóxico formado durante la peroxidación lipídica se ha encontrado elevado en el plasma de pacientes con AR en comparación con un grupo control de pacientes con artrosis ⁷⁵. En pacientes con ACJ se ha observado un aumento de la concentración en plasma de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en comparación con un grupo control ⁷⁶. Otros autores en pacientes con AR han encontrado niveles de vitamina E, beta-carotenos y selenio en plasma más bajos que en el grupo control, pero sin diferencias significativas. El hallazgo principal de este estudio fue el encontrar que el riesgo relativo de padecer la AR fue de 1.6 a 2.3 entre los individuos que presentaron títulos más bajos de vitamina E, beta-carotenos y selenio comparado con los individuos que presentaron concentraciones más altas. Estos resultados

apoyan la hipótesis de que el estrés oxidativo se relaciona con el riesgo de padecer la AR ⁷⁷.

La peroxidación lipídica contribuye en el inicio y en la progresión de la aterogénesis ⁷⁸. Las reacciones iniciadas por los radicales libres en los ácidos grasos poliinsaturados y en el colesterol de las lipoproteínas llevan a la formación de diversos productos que modifican las lipoproteínas y que actúan como agentes nocivos sobre diversas células de la pared arterial. La actividad biológica asociada a las lipoproteínas oxidadas se debe a los diferentes productos formados durante el proceso de oxidación, en concreto, a los hidroperóxidos, oxisteroles y aldehídos ⁷⁹. Los aldehídos, formados durante la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, tienen un potente efecto biológico, con una elevada acción citotóxica en monocitos humanos. La unión de estos aldehídos con la apoB hace que esta lipoproteína modificada sea reconocida por el receptor no regulable o *scavenger* y no por el receptor normal, presente en los macrófagos, dando lugar a la formación de células espumosas ⁸⁰. Además de estos efectos, los aldehídos modulan la respuesta inflamatoria de los macrófagos. Los aldehídos más citotóxicos parecen ser menos pro-inflamatorios, dado que se ha visto que disminuyen la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) ⁸¹.

Las vitaminas E y los carotenos protegen a las LDL de la oxidación con un efecto antiaterogénico debido a su capacidad antioxidante. Los niveles de antioxidantes disminuidos se han asociado a incremento de ECV ⁸².

En conclusión, la peroxidación lipídica, así como la disminución de antioxidantes encontrada en pacientes con AR podrían contribuir a explicar un mayor riesgo de aterosclerosis.

1.3.3. Homocisteína

La homocisteinuria es una alteración congénita del metabolismo de la homocisteína, que da lugar a un aumento de su concentración en plasma. El hecho de que pacientes con homocisteinuria presentaran alteraciones vasculares precoces, llevó a pensar que esta sustancia podía estar implicada en el desarrollo de la aterosclerosis. Estudios *in vitro* han demostrado que la homocisteína es tóxica para el endotelio disminuyendo su capacidad de producir óxido nítrico, además actúa como pro-trombótica e incrementa la producción celular de colágeno. Actualmente, existen estudios clínicos que demuestran que concentraciones elevadas de homocisteína en plasma se asocian de forma directa e independiente con riesgo coronario^{83,84}. En pacientes con AR se ha descrito un aumento de la concentración plasmática de homocisteína en comparación con un grupo control sin la enfermedad⁸⁵.

1.3.4. Tabaquismo

En la aterosclerosis, el tabaquismo es uno de los principales factores etiopatogénicos. Diversos estudios han demostrado que el tabaco induce disfunción endotelial, lo que se ha atribuido al efecto de la nicotina y del monóxido de carbono. Si bien, actualmente se otorga gran importancia a la generación de radicales libres como fuente de alteración del endotelio, los efectos de la misma son entre otros un incremento de la adhesividad leucocitaria, mayor trombogenicidad y vasoespasmo. El tabaco actúa activando el complemento, lo que multiplica los efectos inmunitarios por parte del endotelio. El tabaquismo se ha asociado a una mayor expresión de

integrinas, selectinas y moléculas de adhesión intercelulares (ICAM-1, ICAM-2) y de adhesión vascular (VCAM). Además de la activación del sistema inmunológico, el tabaquismo se ha asociado a un aumento en la secreción de citocinas (interleuquina-1 (IL-1), IL-6; TNF y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), lo cual potencia la actividad inflamatoria de la lesión ateromatosa.

En la AR, el tabaquismo se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer la AR⁸⁶ y con una enfermedad más agresiva⁸⁷. En pacientes con AR, el tabaquismo no se ha relacionado con una mayor morbi-mortalidad por ECV⁴².

1.3.5. Hipertensión arterial

En pacientes hipertensos se han encontrado concentraciones aumentadas de angiotensina II, principal producto del sistema renina-angiotensina. La angiotensina es un potente vasoconstrictor que además de contribuir a la hipertensión, estimula la proliferación de células de la musculatura lisa, activa la lipooxigenasa facilitando la oxidación de lipoproteínas y estimula el proceso inflamatorio en la ateromatosis. Los pacientes hipertensos tienen una mayor capacidad para formar radicales libres lo que provoca alteración a nivel endotelial, así como la formación defectuosa de óxido nítrico, y el incremento de la adhesividad leucocitaria, acciones que facilitan el proceso inflamatorio en la ateromatosis⁸⁸.

En pacientes con AR, la hipertensión arterial se ha asociado a una mayor morbi-mortalidad cardiovascular^{25,42}.

1.3.6. Diabetes Mellitus

La hiperglicemia induce a modificaciones lipoproteicas que resultan en un mayor riesgo aterogénico. La glicosilación de LDL, el aumento de LDL densas y pequeñas, así como la oxidación de HDL facilitan el desarrollo de la placa de ateroma.

La diabetes *Mellitus*, no se ha asociado a un mayor riesgo de ECV en pacientes con AR ^{25,42}.

1.3.7. Otros factores de riesgo

El sexo masculino y la edad avanzada al inicio de la enfermedad son factores de riesgo que se han asociado a una mayor morbi-mortalidad cardiovascular en pacientes con AR ^{25,42}.

Otros factores, como la actividad inflamatoria de la AR, se han relacionado con aumento de ECV en pacientes con AR. Se ha observado que la VSG elevada aumenta significativamente el riesgo de ECV. El tratamiento con glucocorticoides durante un año o más en pacientes con AR que habían sufrido un episodio cardiovascular, parece retardar la aparición de éste, en cambio al inicio de la AR los glucocorticoides incrementan el riesgo de ECV al asociarse a una enfermedad con mayor agresividad y VSG más elevadas. Los pacientes que responden al tratamiento con fármacos inductores de remisión presentan un menor riesgo de ECV ⁴². El número de articulaciones inflamadas es otro parámetro de actividad de la AR que se ha correlacionado positivamente con ECV, independientemente de otros factores de riesgo de ECV ⁸⁹.

Estos resultados implican un incremento de riesgo ECV en relación con la actividad inflamatoria de la AR.

1.4. Ateroma, lípidos y matriz extracelular

1.4.1. Patogenia de la ateromatosis

La teoría más aceptada hoy día sobre el origen de la aterosclerosis es la llamada *respuesta a la lesión*^{90,91}. Según ésta la disfunción endotelial sería el proceso inicial de la lesión. Los estímulos nocivos que pueden provocar la disfunción endotelial de la pared arterial son: el aumento de LDL, la disminución de HDL, la modificación de la LDL (glicación y oxidación), el aumento de los niveles de Lp(a), la hipertensión arterial, la hiperhomocisteinemia, el tabaco, la diabetes *mellitus*, respuestas inmunológicas mediadas por células T, posibles infecciones por virus o agentes como la *Chlamydia pneumoniae*, alteraciones genéticas y combinaciones de éstos u otros factores⁸⁸. Así podemos considerar que la primera lesión consiste en una alteración del endotelio, inducida por la noxas mencionadas. Estos cambios a nivel del endotelio dan lugar a una alteración de la permeabilidad a las lipoproteínas, principalmente las LDL, permitiendo su entrada en la íntima. Las lipoproteínas, en la íntima, quedan retenidas en la matriz extracelular pudiendo ser modificadas por la acción de radicales libres y enzimas oxidativos. Como consecuencia de la activación del endotelio se expresan diferentes moléculas que facilitan la adhesión de leucocitos. Entre las más importantes destacan las moléculas de adhesión

(VCAM-1, ICAM-1), la selectina E y la P-selectina. La migración de los leucocitos (monocitos y linfocitos T) hacia la íntima de la pared arterial está mediada por la LDL oxidada y moléculas quimiotácticas secretadas por el endotelio y las células de la musculatura lisa como la proteína quimiotáctica para monocitos (MCP-1), la interleuquina 8 (IL-8) y el PDGF. Una vez los monocitos entran en el espacio subendotelial se activan y se diferencian a macrófagos. Esta activación comporta una regulación al aumento (up-regulation) de receptores de membrana, citocinas (TNF- α , IL-1), factor de crecimiento y transformación (TGF- β), enzimas proteolíticas (metaloproteasas) y factores de crecimiento (PDGF), los cuales pueden afectar a las células presentes en la íntima arterial: macrófagos, linfocitos T, células de musculatura lisa y células endoteliales.

Así entre los procesos que intervienen en la formación de lesiones de aterosclerosis está la migración, proliferación y acumulación de macrófagos, linfocitos T y células de la musculatura lisa; la formación de matriz extracelular y la acumulación de lípidos en macrófagos, células de la musculatura lisa y matriz extracelular.

1.4.2. Placa inestable

La rotura de la placa de ateroma es la principal causa del episodio coronario agudo⁹². El riesgo de rotura de una placa depende del tipo de placa, es decir, de su composición y vulnerabilidad, y no tanto del grado de estenosis que presente. Las placas vulnerables se caracterizan en general por un gran núcleo lipídico, con una cubierta fibrosa fina y un reducido contenido de fibras de colágeno. La integridad del núcleo fibroso y, por tanto, la resistencia a romperse o fisurarse, depende de la

matriz extracelular, a la vez que ésta depende del balance entre síntesis y degradación de fibras de colágeno sintetizadas por las células musculares lisas. Se ha considerado que las placas vulnerables tienen un acentuado componente inflamatorio con un incremento del contenido de macrófagos y linfocitos T en las zonas con tendencia a la rotura, así como de mastocitos y mayor expresión de marcadores de inflamación ⁹³. Los macrófagos de la placa, como respuesta a diversos estímulos, por ejemplo por un aumento del estrés oxidativo ⁹⁴, incrementan la expresión de enzimas proteolíticos (metaloproteasas, colagenasas, estromelisina y gelatinasa) que degradan la matriz extracelular contribuyendo a la rotura de núcleo fibroso ⁹⁵.

1.4.3. Función de la matriz extracelular

La matriz extracelular vascular (MEV) es un material de refuerzo compuesto por fibras de colágeno y elásticas embebidas en una especie de gel viscoso constituido por proteoglicanos, glicoproteínas, hialuronato y agua. Este componente junto a la función de dar consistencia, resistencia y elasticidad a la pared arterial, juega un papel fundamental en el control de las acciones biológicas que acontecen en la pared arterial y por tanto en el desarrollo de la lesión aterosclerosa.

Las fibras de la MEV actúan también reteniendo los distintos factores quimiotácticos, citocinas, factores de crecimiento, y permitiendo el anclaje y migración celular. Es de gran importancia el papel que juegan modificando y modulando la presencia de LDL y otras lipoproteínas en la pared vascular. Las LDL quedan atrapadas en la MEV lo que permite que sean objeto de la acción de

radicales libres y enzimas oxidativos. Los proteoglicanos y hialuronos participan en la regulación de la permeabilidad vascular, el metabolismo lipídico y la trombosis. Además interactúan con las células vasculares, con los factores de crecimiento y citocinas, modificando sus características biológicas, así como la adhesividad, migración y proliferación celulares⁹⁶.

La fuente fundamental de colágeno en la pared arterial son las células de musculatura lisa. Durante su proliferación en la íntima adquieren el fenotipo sintético produciendo colágeno, su presencia es importante como componente de la cicatrización de la lesión tisular, y en el caso de la placa de ateroma da consistencia a la misma y permite que resista a los cambios de presión, flujo y tensiones de zizallamiento evitando su fisurización. Las fibras elásticas juegan un papel similar al descrito, y son las que van a permitir el depósito de calcio. Las calcificaciones de las placas se suelen localizar en dichas fibras⁹⁶.

1.4.3.1. Proteoglicanos de la matriz extracelular

La organización de los proteoglicanos se basa en una proteína central a la que se unen covalentemente una o varias cadenas de diversos polisacáridos ácidos, los glucosaminoglicanos. Existen diversas clases de glucosaminoglicanos que difieren en las unidades disacáridas que constituyen sus cadenas lineales. Los más comunes son el heparán sulfato, el dermatán sulfato y el condroitín sulfato.

El versicán es un proteoglicano con 5-10 cadenas de condroitín sulfato unido a una proteína central y es el proteoglicano más abundante de la matriz extracelular en la pared de la íntima. El biglicán es un proteoglicano con dos cadenas de heparán

sulfato unidas a una proteína central, se localiza a nivel pericelular anclado en la membrana de las células del endotelio y de la musculatura lisa.

Dichos polímeros y debido a la presencia en cada unidad que discurre entre grupos sulfatos y carboxilos, cargados negativamente, son capaces de interactuar con un gran número de proteínas a través de asociaciones con segmentos peptídicos ricos en los aminoácidos lisina y arginina que tienen cargas laterales con grupos aminos cargados positivamente. Varias de estas asociaciones entre proteoglicanos y proteínas tienen consecuencias biológicas importantes. Este es el caso del heparán en la cara luminal del endotelio que, al asociarse a la antitrombina III, la activa y hace que mantenga inactiva la trombina. Dicho proceso es el principal responsable en el mantenimiento de las propiedades no trombóticas del endotelio⁹⁷.

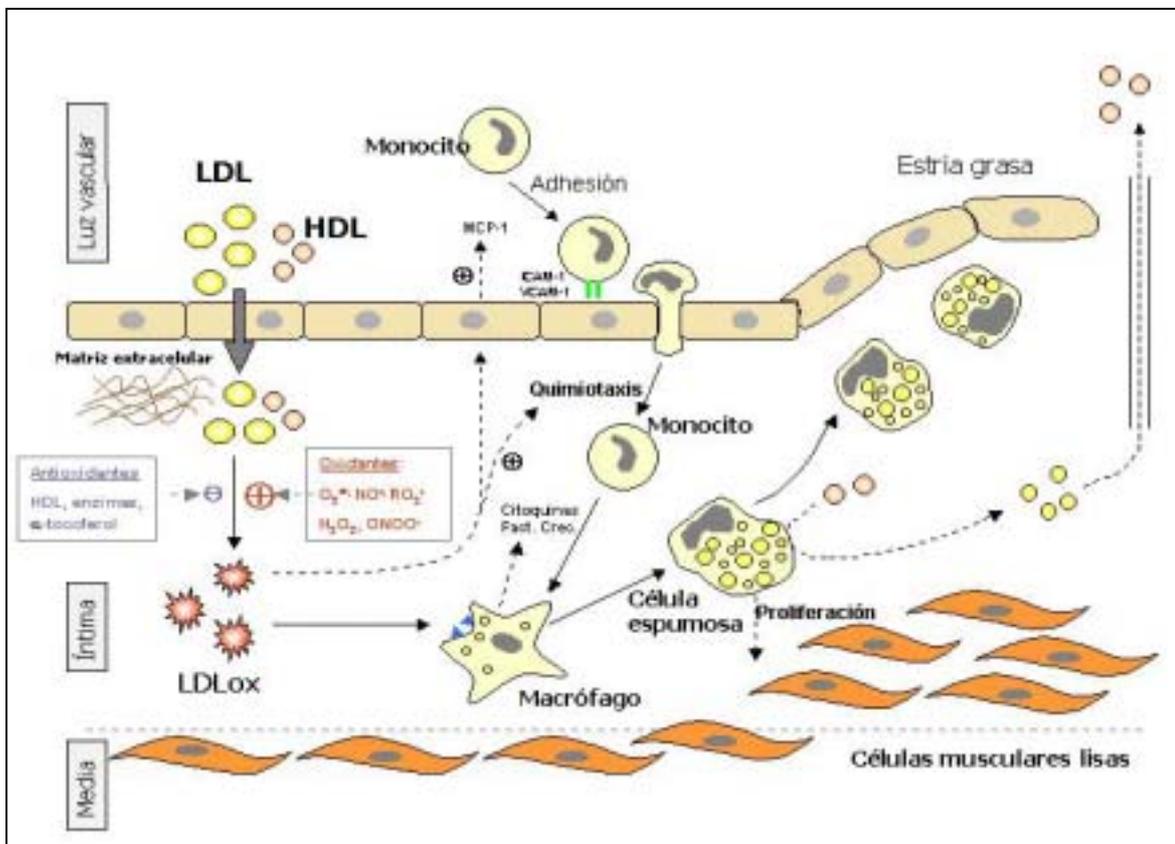
Para que se desarrolle la lesión ateromatosa es necesario que la íntima alcance un espesor apreciable. Es de esperar, que cuanto más considerable sea el espesor de la íntima de la pared arterial más oportunidades tendrán las lipoproteínas que entran en este espacio de interactuar con sus constituyentes⁹⁸.

El principal proteoglicano que parece responsable de la asociación con las lipoproteínas en arterias humanas pertenece a la familia de los versicanos^{99,100}.

Se han identificado un mínimo de 2 segmentos ricos en lisina y arginina en la apoproteína B-100 (apoB-100) causante de la asociación de la partícula lipoproteica con el versicán¹⁰¹.

Estudios realizados con material extraído de lesiones de la íntima humana sugieren que las lipoproteínas unidas a versicanos se encuentran formando desde complejos fácilmente dissociables hasta grandes agregados insolubles¹⁰².

Figura 1. Papel de las lipoproteínas oxidadas en el desarrollo de la aterosclerosis. Las LDL circulantes pueden atravesar el endotelio vascular y quedar retenidas en la matriz extracelular. Los radicales libres presentes en el espacio subendotelial inician el proceso de peroxidación lipídica. Las LDL son quimiotácticas para los monocitos y modulan la actividad inflamatoria de los macrófagos a través de citoquinas y factores de crecimiento. Las LDL oxidadas son internalizadas por los receptores *scavengers* y dan lugar a la formación de las células espumosas.



In vitro, cuando las LDL se asocian a proteoglicanos de la matriz extracelular de la íntima, aumentan su oxidabilidad al modificar su estructura y al incrementar el tiempo de permanencia en este microambiente tan adecuado que es la íntima^{103,104}. Además, los complejos LDL-proteoglicanos, especialmente versicán, son captados más ávidamente por los macrófagos. El resultado de este proceso es doble, por una parte se crea una partícula modificada, que no es reconocida por los receptores LDL normales sino por receptores especiales o "*scavengers*". Estos receptores especiales están presentes en los macrófagos. En segundo lugar se

forman una serie de productos derivados de la oxidación lipídica que son fundamentalmente oxisteroles, hidroperóxidos y aldehídos derivados de la oxidación de ácidos grasos. Todas estas sustancias inducen una importante reactividad biológica y tendrán una función importante en la disfunción endotelial, la respuesta inflamatoria o la proliferación celular propias de la ateromatosis.

1.4.3.2. Afinidad de las LDL densas y pequeñas por proteoglicanos de la matriz extracelular

Las LDL densas y pequeñas presentan un contenido menor en fosfolípidos y colesterol libre en su superficie, lo que las distingue de las LDL promedio ¹⁰⁵. Las LDL densas y pequeñas parecen ser un excelente marcador de la susceptibilidad a presentar enfermedades cardiovasculares, el fenotipo b de las LDL, y parecen originarse por la acción continua de la lipoproteínlipasa (LPL) sobre una subpoblación especial de las VLDL, y posiblemente por una acción semejante de la lipoproteínlipasa hepática (HLPL) sobre remanentes de la VLDL, y sobre las misma LDL ^{106,107}.

Una de las razones por la cual las LDL densas y pequeñas tienen una mayor aterogenicidad, es debido a su facilidad para atravesar el endotelio vascular y a que presentan una mayor afinidad por los proteoglicanos de la pared arterial. Además, una vez que estas LDL han presentado interacciones con los proteoglicanos de la MEV son captadas de manera más eficiente por los macrófagos ¹⁰⁸. Se ha encontrado que la alta afinidad de la LDL por los proteoglicanos medida *in vitro* se relaciona con manifestaciones clínicas de la aterosclerosis ¹⁰⁹. Se cree que la mayor

afinidad de las LDL densas y pequeñas por los proteoglicanos está causada por una composición más favorable de los segmentos positivos de la apoB-100 en la superficie de la partícula cuando se hace más pequeña ¹¹⁰. Otra característica que hace que las LDL densas y pequeñas sean más aterogénicas es debido a que presentan una mayor susceptibilidad a la oxidación por radicales libres ¹¹¹.

1.5. Ateroma y oxidación lipídica

La aterogenidad de las lipoproteínas depende de su estructura y concentración cuando circulan en sangre y de las modificaciones estructurales y químicas subsiguientes a la retención en el espacio subendotelial. Debido a la fuerte asociación encontrada en numerosos estudios entre concentraciones elevadas de colesterol-LDL y enfermedad ateromatosa, el estudio de la oxidación lipídica se ha centrado mayoritariamente en la LDL, por ser ésta la principal lipoproteína transportadora de colesterol plasmático. Uno de los hechos más importantes en el desarrollo de la placa de ateroma es la formación de células espumosas a partir de monocitos procedentes de la circulación sanguínea. Estudios *in vitro* permitieron objetivar la dificultad de inducir la formación de células espumosas mediante la incubación de LDL nativa y macrófagos. Se pudo determinar que las LDL debían estar alteradas, modificadas para acumularse en el interior de los macrófagos. De las modificaciones que pueden alterar las LDL las de mayor transcendencia biológica son la glicación de la apoB en diabéticos y la oxidación lipídica, ambas producen un incremento de carga negativa en las LDL y hacen que sean reconocidas por receptores no regulables o *scavengers* ¹¹².

1.5.1. Mecanismos implicados en la oxidación lipídica

La LDL es el principal blanco de la oxidación mediada por radicales libres en la íntima. La LDL es una partícula esférica constituida por un núcleo apolar donde se localizan los ésteres de colesterol y triglicéridos envueltos de una superficie más polar de fosfolípidos, colesterol libre, apoB-100 y antioxidantes. La LDL no es una partícula fácilmente oxidable, ya que en ella se transportan antioxidantes liposolubles como son la vitamina E y el retinol. Cuando se encuentran en el plasma son difícilmente oxidables, ya que además de los antioxidantes liposolubles, existen otros antioxidantes, tales como la vitamina C, el ácido úrico, proteínas como la albúmina o la ceruloplasmina que fija el Cu^{++} o la transferrina que fija el Fe^{+++} . Un posible candidato a oxidar *in vivo* las lipoproteínas en el espacio subendotelial es la hemina. Esta molécula es el producto de degradación de la hemoglobina. La hemina en presencia de suero diluido y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es capaz de oxidar la LDL dando lugar a la formación de dienos conjugados, TBARS y F_2 -isoprostanos. La hemina modifica la carga de la LDL y oxida los lípidos ¹¹³.

Experimentos realizados *in vitro* muestran que las células endoteliales, células de musculatura lisa, monocitos y macrófagos pueden oxidar a la LDL ^{114,115,116}. Los mecanismos que explican la oxidación mediada por células son varios: la presencia de hierro o cobre extracelular, la enzima intracelular lipooxigenasa, especies reactivas de nitrógeno, como el peroxinitrito formado a partir de óxido nítrico y el ión superóxido; la mieloperoxidasa, enzima secretada por los macrófagos que generan especies oxidantes y radicales.

Dado que el mecanismo de oxidación *in vivo* no está claro, hay una gran variedad de condiciones experimentales para preparar lipoproteínas oxidadas que se utilizan

para experimentos *in vitro*. La oxidación lipídica con iones de cobre es uno de los sistemas más utilizados *in vitro* (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones que se utilizan para preparar LDLox *in vitro*

-
- LDLox con peroxidación lipídica
 - Iones metálicos: cobre, hierro
 - Hemina
 - Sustancias que generan radicales:
 - AAPH(2,2'-azobis-(2-midinopropane)dihydrochlorid)
 - AMVN (2,2'-azobis-(2,4-dimethylvaleronitrile))
 - Oxidación mediadas por células:
 - Células endoteliales
 - Macrófagos
 - Monocitos
 - Células de la musculatura lisa
 - Radiación ultravioleta
 - Enzimas
 - Lipooxigenasa: 15-lipooxigenasa
 - Ciclooxigenasa
 - Fosfolipasa: Fosfolipasa A₂
 - NAPH oxidasa
 - LDLox con leve peroxidación lipídica
 - Prolongado periodo de almacenamiento a 4° C
 - Concentraciones de cobre o hierro bajas
 - Poco tiempo de exposición con el pro-oxidante
 - LDLox con oxidación de la parte proteica
 - Mieloperoxidasa
-

1.5.2. Peroxidación lipídica

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las lipoproteínas contribuye a la aterogénesis. La idea fundamental es que las reacciones iniciadas por los radicales libres en los ácidos grasos poliinsaturados y el colesterol de las lipoproteínas llevan a la formación de diversos productos que modifican la apoB-100 y que actúan como agentes nocivos sobre diversas células de la pared arterial.

La peroxidación lipídica se inicia cuando un radical libre ($X\cdot$) capta un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado (PUFA) (LH) unido a uno de los lípidos que constituyen la lipoproteína. El radical libre se hace estable (XH) y por el contrario un radical lipídico ($L\cdot$), el cual reacciona muy rápidamente con el oxígeno molecular, crea un radical peroxil ($LOO\cdot$). Este radical libre peroxil capta un átomo de hidrógeno de un PUFA adyacente (LH) y se forma el hidroperóxido lipídico ($LOOH$) y un nuevo radical lipídico ($L\cdot$), iniciándose una reacción en cadena que irá oxidando los PUFAs cercanos. Esta reacción en cadena puede pararse por la presencia de antioxidantes, como por ejemplo, la vitamina E. Los antioxidantes ceden un hidrógeno al radical peroxil y se convierten ellos en radicales libres, se forma un hidroperóxido pero ningún radical lipídico, acabándose así la reacción en cadena.

El resultado del proceso de peroxidación lipídica de la LDL es una partícula lipídica con características diferentes a la molécula de la cual proviene (Tabla 2).

Tabla 2. Características de las LDLox en comparación con las LDL nativas

- Pérdida de antioxidantes
 - Incremento de densidad de 1.019-1.063 a 1.060-1.080 g/ml
 - Aumento del tamaño de la partícula de 22 nm a 25 nm
 - Incremento de la carga negativa y de la movilidad electroforética
 - Tendencia a agregarse
 - Disminución de ésteres de colesterol
 - Transformación de colesterol a oxisteroles
 - Pérdida de ácidos grasos poliinsaturados
 - Formación de dienos conjugados
 - Formación de hidroperóxidos
 - Formación de aldehídos
 - Formación de isoprostanos
 - Disminución de fosfatidilcolina y aumento de lisofosfatilcolina
 - Fragmentación de la apoB
 - Unión covalente de la apoB con aldehídos
 - Capacidad inmunológica
 - Incremento de la captación por macrófagos
-

Se han descrito numerosas metodologías para el estudio de la oxidación lipídica, basadas en la caracterización física, química, metabólica y/o inmunológica de la partícula lipoproteica (Tabla 3).

Tabla 3. Metodología más utilizada en los estudios de oxidación lipídica

- Caracterización química

Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARs)

Dienos conjugados

Productos derivados de la oxidación (aldehídos, oxisteroles, hidroperóxidos, isoprostanos)

 Cromatografía de intercambio iónico (FPLC)

 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

 Cromatografía de gases / espectrofotometría de masas (GC/MS)

- Caracterización física

 Carga eléctrica

 Electroforesis en geles de agarosa

 Caracterización de la proteína

 Electroforesis en geles de poliacrilamida

- Caracterización metabólica (internización de lipoproteínas por los macrófagos).

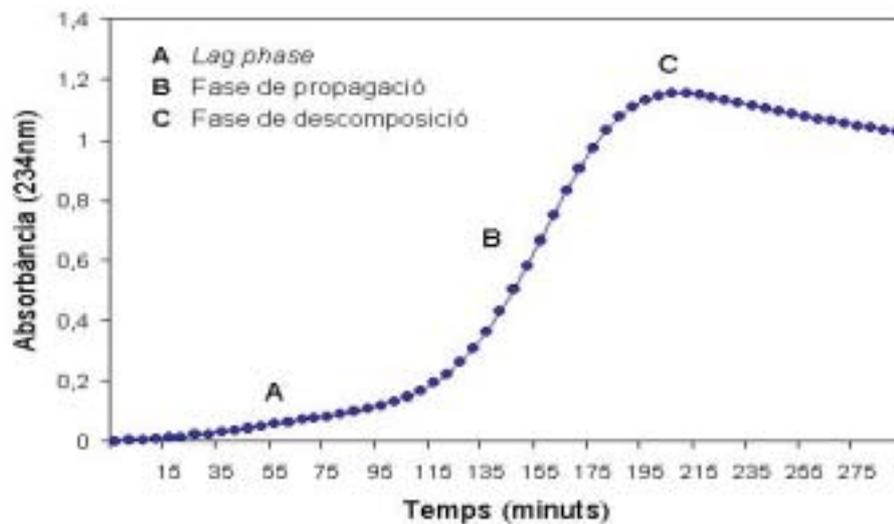
- Caracterización inmunológica (anticuerpos contra proteínas modificadas con HNE, MDA)

1.5.3. Cinética de la oxidación lipídica de lipoproteínas

La oxidación lipídica en presencia de cobre o de hemina se divide en tres fases temporales consecutivas: 1) lag time o *lag phase* 2) fase de propagación y 3) fase de descomposición. Estas tres fases son el resultado de la oxidación de los PUFAs a hidroperóxidos lipídicos cuando los dobles enlaces carbono-carbono se convierten en dobles enlaces conjugados (=dienos) con un máximo de absorción de 236 nm

En la *lag phase* se produce el consumo de antioxidantes de la partícula lipoproteica. El α -tocoferol es el primer antioxidante en consumirse y posteriormente el β -caroteno. Durante este periodo no se produce peroxidación lipídica. Cuanto más dure esta fase, menos susceptible será la partícula a la oxidación.

Figura 2. Cinética de la oxidación de la LDL con formación de dienos conjugados. (A) *lag phase*, (B) Fase de propagación, (C) Fase de descomposición.



Una vez se han consumido los antioxidantes empieza la fase de propagación, en ésta se inicia la cadena de peroxidación lipídica y se van oxidando los PUFAs presentes en la partícula lipoproteica hasta que se acaben y se inicie la fase de descomposición, en la que se empieza a formar productos finales más estables como los aldehídos. Durante la *lag phase*, la fase de propagación y el inicio de la

fase de descomposición, la formación de dienos conjugados en el tiempo refleja el perfil temporal de los hidroperóxidos lipídicos.

1.5.4. Efectos biológicos de las lipoproteínas oxidadas:

Las lipoproteínas oxidadas están implicadas durante todo el proceso del desarrollo de la placa de ateroma.

Principales efectos biológicos de las LDLox que favorecen la aterogénesis

- Formación de células espumosas
 - Aumento de la adhesión de monocitos al endotelio
 - Quimiotaxis de monocitos y linfocitos
 - Crecimiento y diferenciación de monocitos
 - Activación de macrófagos
 - Afectación del tono vascular, permeabilidad endotelial, coagulación y trombosis
 - Citotoxicidad y apoptosis celular
 - Proliferación de células musculares lisas
-

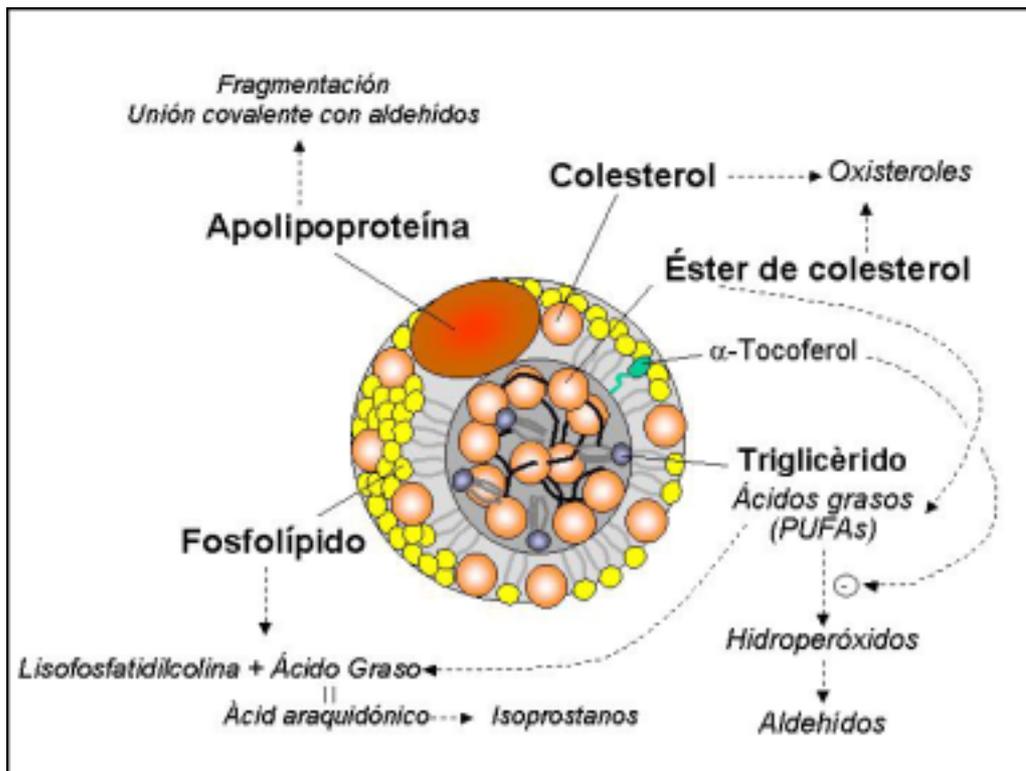
1.5.5. Productos derivados de la oxidación lipídica

El proceso de la peroxidación lipídica ha sido bien estudiado en la LDL. La LDL es una partícula esférica constituida por un núcleo apolar donde se localizan los ésteres de colesterol y triglicéridos envueltos por una superficie más polar de fosfolípidos, colesterol libre, apoproteína B-100 y antioxidantes. Los ácidos grasos

insaturados son los lípidos susceptibles a la peroxidación lipídica. La oxidación de la LDL se inicia en la superficie de la lipoproteína por la presencia de algún radical libre preexistente y posteriormente se propaga hacia el núcleo.

Del proceso oxidativo se derivan los siguientes subproductos. (Figura 3).

Figura 3. Estructura y composición de las LDL y productos derivados de su oxidación.



Hidroperóxidos (LOOH)

Los hidroperóxidos se forman durante la fase de propagación en cadena de la peroxidación lipídica de los PUFAs, cuando un radical peroxil ($LOO\cdot$) capta un átomo de hidrógeno de un lípido adyacente, formándose un peróxido lipídico y un nuevo radical lipídico. Del ácido linoleico derivan los hidroperóxidos, los ácidos

hidroperoxioctadecadienoicos (9- y 13-HPODE) y los correspondientes hidroxilos (LOH), los ácidos hidroxiocetadecadienoicos (9- y 13-HODE); del ácido arquidónico, los ácidos hidroxiperoxieicosatetraenoicos (5-, 8-,9-,11-,12-,15-HPETE) y los correspondientes hidróxilos, los ácidos hidroxiieicosatetraenoicos (5,8,9,11,12,15-HETE); del ácido oleico, los 8-,10-, y 11-ácido hidroperoxioctadecenoico. Si se oxidan los PUFAs esterificados se forman los correspondientes colesteryl éster hidroperóxidos (CEOOH), fosfolípido hidroperóxidos (PLOOH) y triglicérido hidroperóxido (TGOOH). Los HODEs y los colesteryl-HODEs están presentes en el ateroma humano ¹¹⁷. El 9-HETE es un buen marcador de estrés oxidativo y se ha propuesto como marcador biológico de la evolución de placas estables hacia placas inestables ¹¹⁸.

La 15-lipooxigenasa oxida ácidos grasos libres y esterificados para formar hidroperóxidos. La acción de la 15-lipooxigenasa sobre el ácido linoleico produce mayoritariamente 13-HPODE y sobre el ácido arquidónico el 15-HPETE.

En el plasma, los hidroperóxidos son transportados principalmente por la HDL. Las células hepáticas captan los colesteryl éster hidroperóxidos de las lipoproteínas. En macrófagos, la internalización de las LDL oxidadas a través del receptor *scavenger* causa una acumulación intracelular de hidroperóxidos e hidróxilos en los lisosomas contribuyendo a la formación de células espumosas.

Los efectos biológicos atribuibles a los hidroperóxidos están relacionados con la modulación de la respuesta inflamatoria. El 9-HODE y el 13-HODE, inducen la secreción de IL-1 en monocitos-macrófagos ¹¹⁹. Los HPODE dañan el endotelio y alteran el metabolismo de los proteoglicanos disminuyendo sus niveles ¹²⁰. Los hidroperóxidos del ácido linoleico son citotóxicos en células endoteliales ¹²¹.

Aldehídos

Los aldehídos están constituidos por una cadena hidrocarbonada unida a un grupo carbonil. Proviene de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos que se forman durante los procesos de autooxidación de las grasas¹²². La formación de los diferentes tipos de aldehídos dependerá del ácido graso poliinsaturado de cual provenga. Así en la LDL oxidada, los aldehídos cuantitativamente mayoritarios son el hexanal y el 4-HNE que derivan de la oxidación de los PUFAs n-6, el ácido linoleico y el ácido arquidónico. La mayoría de los aldehídos son compuestos apolares y por tanto permanecen asociados a la partícula lipoproteica, excepto el malondialdehído (MDA) que es polar. Los aldehídos tienen una elevada reactividad con residuos de cisteína, lisina e histidina de las proteínas a las que se unen covalentemente. La unión covalente de los aldehídos con los grupos amino de los residuos de lisina de la apoB implica la formación de estructuras inmunogénicas llamadas epítopos específicos de oxidación (4-HNE, MDA) que son reconocidos en las LDL oxidadas por el receptor *scavenger* de los macrófagos⁸⁰. Los aldehídos también pueden unirse covalentemente con aminoácidos de la apoA-1 durante el proceso de lipoperoxidación y disminuyen la actividad de la lecitín colesterol acil transferasa (LCAT) afectando el transporte reverso del colesterol¹²³. Otro de los efectos de los aldehídos es su conocida citotoxicidad¹²⁴. El 4-HNE tiene propiedades citotóxicas, mutagénicas y hepatotóxicas. Además, en situaciones de estrés oxidativo se han encontrado concentraciones elevadas de 4-HNE tanto en plasma como en órganos.

Oxisteroles

Son moléculas de 27 carbonos que provienen de la oxidación del colesterol. Son biológicamente activas y algunas de ellas se han visto implicadas en el inicio y desarrollo de la aterosclerosis.

Tabla 4. Principales oxisteroles en plasma

- Colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol	- 7-cetocolesterol
- 5,6-apoxicolesterol	- 7 β -hidroxicolesterol
- 25-hidroxicolesterol	- 7 α -hidroxicolesterol

Los oxisteroles que se forman *in vivo* se pueden generar a partir de un proceso de oxidación no enzimática o por la acción enzimática de las hidroxilasas. Los oxisteroles son sustratos para la LCAT y acil CoA colesterol acil transferasa (ACAT). En plasma, se encuentran predominantemente en forma esterificada por acción de la LCAT. Los niveles plasmáticos de oxisteroles se asocian positivamente con el colesterol plasmático. En el plasma, los oxisteroles se encuentran asociados a lipoproteínas, principalmente LDL y HDL, y a la albúmina. Las LDL electronegativas (LDL⁻), consideradas más aterogénicas, están más enriquecidas en oxisteroles que las LDL nativas¹²⁵. Cuando las LDL se oxidan *in vitro*, se forman oxisteroles¹²⁶. Los macrófagos captan los oxisteroles que están asociados a las LDL oxidadas por endocitosis. Mayormente, los oxisteroles se localizan en las membranas celulares, como el colesterol, y pueden afectar la estructura y función de las proteínas asociadas a las membranas. Regulan muchas de las vías metabólicas sensibles al colesterol. Así, regulan la transcripción de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-

CoA) reductasa y la expresión del receptor LDL. La transcripción de estos genes está regulada por la familia de proteínas que unen elementos reguladores de esteroides (SREBPs). La unión de los oxisteroides a la proteína que une oxisteroides (OSBP) inhibe la expresión de la HMG-CoA reductasa. En macrófagos, los oxisteroides estimulan la ACAT y por tanto la esterificación y la acumulación de ésteres de colesterol y disminuyen la actividad de la lipasa sensible a las hormonas que se encargan de generar colesterol libre que pueda ser captado por las HDL. Por tanto, la acción de los oxisteroides en los macrófagos podría ser considerada pro-aterogénica.

Los oxisteroides juegan un papel importante en el inicio de las lesiones ateroscleróticas ya que se ha visto que los oxisteroides circulantes pueden causar daño en el endotelio y acumulación de colesterol en la pared de la aorta ¹²⁷. Los oxisteroides regulan la expresión de proteínas moduladoras de la inflamación al estimular la expresión de determinadas citoquinas, inhiben la producción de óxido nítrico y son citotóxicos para células endoteliales, macrófagos, células de musculatura lisa y linfocitos. El mecanismo de su citotoxicidad puede ser debido a la inhibición de la HMG-CoA reductasa, al intercambio del colesterol por oxisteroides en la membrana plasmática modificando así propiedades vitales de las células o bien por un mecanismo de apoptosis ^{128,129}.

Lisofosfatidilcolina

La lisofosfatidilcolina forma parte de las LDL oxidada y se forma por acción de la fosfolipasa A2. La fosfatidilcolina es un potente quimioatrayente para monocitos y linfocitos ¹³⁰, induce la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) en

células endoteliales ¹³¹, y la proliferación y migración de células de musculatura lisa ¹³², además de modular la producción de citocinas proinflamatorias ¹³³.

Isoprostanos

Los isoprostanos son productos activos derivados del metabolismo del ácido arquidónico a través de un proceso de modificación oxidativa no dependiente de la ciclooxigenasa. Son isómeros de la prostaglandina formados por la acción de los radicales libres sobre los fosfolípidos de membrana celular o de las lipoproteínas circulantes. Se liberan como respuesta a una activación celular a través de un mecanismo mediado por la fosfolipasa. Circulan por el plasma y son excretados por la orina. Pueden circular libres o esterificados con fosfolípidos por el plasma ¹³⁴. Por inmunocitoquímica se han localizado F₂-isoprostanos en monocitos/macrófagos y células musculares lisas de tejido aterosclerótico humano ¹³⁵. La excreción urinaria de F₂-isoprostanos se ha descrito como marcador de estrés oxidativo en enfermedades vasculares.

Los efectos biológicos de los isoprostanos están ligados a fenómenos de activación celular, tales como la activación plaquetaria y proliferación de células de musculatura lisa, además de ser potentes vasoconstrictores.

1.5.6. Vitaminas antioxidantes

El término antioxidante se utiliza para describir cualquier sustancia que, en concentraciones más bajas que las del sustrato al cual protege, inhibe o retarda la oxidación de éste ¹³⁶.

En cuanto a su mecanismo de acción, los compuestos que destruyen directamente radicales libres se llaman radical *scavenger* ¹³⁷. El organismo tiene numerosos mecanismos detoxicantes para proteger las células de los efectos tóxicos de radicales libres. Estos incluyen enzimas protectores (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión transferasa) y moléculas con acción antioxidante como es el escorbato, la albúmina, el ácido úrico, la bilirrubina, el α -tocoferol y el β -carotenos entre otros. La inhibición de la lipoperoxidación lipídica es el principal mecanismo a través del cual los antioxidantes ejercen su acción antiaterogénica.

Los antioxidantes pueden provenir de la dieta o de síntesis endógena. Los principales antioxidantes son la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina E (α -tocoferol), y el β -caroteno (carotenoide precursor de la vitamina A).

La vitamina E: Incluye a los compuestos lipofílicos llamados tocoferoles y tocotrienos. El α -tocoferol constituye el 90% del total de los tocoferoles existentes en los tejidos animales. Su principal función es la de proteger a los ácidos grasos poliinsaturados contra el daño oxidativo ¹³⁸. El α -tocoferol actúa como un *scavenger* de radicales libres, reacciona muy rápidamente con los radicales libres peroxil y alcoxil, productos derivados de la peroxidación lipídica, dando lugar a un α -tocoferoxil. El radical α -tocoferoxil es rápidamente reciclado por el ácido ascórbico y el ubiquinol. En determinadas condiciones el radical α -tocoferol· puede iniciar la reacción en cadena de la oxidación de los PUFAs y comportarse como una molécula pro-oxidante ¹³⁹.

β -carotenos: Es un compuesto lipofílico que forma parte de la familia de los carotenoides. Además de su función como precursor de la vitamina A, tiene acción antioxidante.

1.6. Inflamación y ateroma: relación con la fosfolipasa A2 secretora

Estudios histológicos de lesiones ateroscleróticas llevadas a cabo en humanos y en modelos animales han demostrado que la aterogénesis comparte características con un proceso inflamatorio. Estas son: adhesión e infiltración de leucocitos a través del endotelio, proliferación celular, acumulación de material extracelular y destrucción de tejido conectivo. La detección en la pared arterial de enzimas como la fosfolipasa A2 secretora (sPLA2) y citocinas pro-inflamatorias IL-1, TNF- α , IFN- γ o IL-8 confirma la presencia de procesos inflamatorios asociado al desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

La sPLA2 hidroliza el grupo acil de la posición sn-2 de los fosfolípidos. El resultado de la acción de esta enzima es la formación de ácidos grasos libres y un lisofosfolípido que puede ser metabolizado generando mediadores lipídicos, tales como eicosanoides, factores de activación de plaquetas (PAF) y lisofosfolípidos.

Esta enzima existe en tres formas bien caracterizadas, además de otras no bien conocidas. Las formas secretoras de bajo peso molecular sPLA2 I y II, y la citoplasmática de alto peso molecular cPLA2, que son productos de genes diferentes¹⁴⁰.

La sPLA2, del grupo II, no pancreática, tiene un peso molecular de 14 kDa, con siete puentes disulfuros que la hacen muy estable. La sPLA2 es altamente catiónica, lo cual permite interacciones electrostáticas entre esta enzima y los glucosaminoglicanos. La sPLA2 es activa a pH neutro y requiere de la presencia de calcio, esto significa que su actividad es óptima en condiciones que prevalecen en el medio extracelular ¹⁴¹.

La sPLA2 es secretada por diferentes células, entre ellas células de musculatura lisa, monocitos, neutrófilos y sinoviocitos. La actividad de la sPLA2 es estimulada por distintas citocinas como el TNF- α y la IL-1 ^{142,143}. En algunas células como son las plaquetas, la formación de mediadores de inflamación mediada por la sPLA2, ocurre a través de receptores específicos que son activados por la unión con agonistas como la trombina y el complemento. Una de las consecuencias de la activación de la sPLA2 es la hidrólisis de ácidos grasos poliinsaturados de fosfolípidos de membranas celulares con la consiguiente liberación de ácido arquidónico. El ácido arquidónico por acción de las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa es metabolizado a prostaglandinas y leucotrienos, importantes mediadores de la inflamación ¹⁴⁴.

1.6.1. Fosfolipasa A2 secretora y artritis reumatoide

En estudios animales la administración subcutánea de sPLA2 da lugar a una respuesta inflamatoria. Además, la inyección intraarticular de sPLA2 en ratones induce proliferación e hiperplasia de la membrana sinovial, cambios similares a los observados en la membrana sinovial de pacientes con AR. Estas investigaciones

demuestran que la sPLA2 juega un papel esencial en los procesos inflamatorios y en la AR ¹⁴⁴. En el líquido sinovial y en el plasma de pacientes con AR se han encontrado una elevada actividad de la sPLA2 en comparación con un grupo control ^{145,146}. Cuando se correlacionaban niveles de actividad de sPLA2 en plasma y parámetros clínicos de actividad de la AR, algunos autores no encontraron correlación ¹⁴⁵ y otros observaron una correlación positiva ¹⁴⁷.

1.6.2. Fosfolipasa A2 secretora y ateroma

Existen evidencias de que la sPLA2 no es sólo un marcador de inflamación sistémica, sino que también puede alterar en plasma el metabolismo lipídico.

En las LDL, la acción hidrolítica de la sPLA2 juega un papel importante en la aterogénesis. Estudios acerca de la composición de las lipoproteínas aisladas de lesiones humanas indican que una de las primeras alteraciones que tiene lugar en la íntima es la hidrólisis del principal fosfolípido de las lipoproteínas, la lecitina o fosfatidilcolina ¹⁴⁸. De las enzimas que pueden hidrolizar los fosfolípidos de las LDL en la íntima, la sPLA2 ha sido una de las más investigadas. La sPLA2 es secretada por diversas células entre ellas las células de la musculatura lisa. Existe evidencia científica de que la sPLA2 se halla en la íntima y en la media de lesiones humanas ateroscleróticas y que además es capaz de hidrolizar los fosfolípidos de las LDL dando lugar a lisolecitina y ácidos grasos ^{149,150}. La sPLA2 al ser una proteína con gran exceso de arginina y lisina, una vez secretada, es retenida en los proteoglicanos de la matriz extracelular ^{151,152}. Las modificaciones de las LDL en la pared arterial mediadas por la sPLA2 tienen un gran número de

potenciales efectos aterogénicos. La sPLA2 modifica las partículas de LDL aumentando su afinidad por los proteoglicanos de la matriz extracelular, lo cual podría favorecer la retención y acumulación de estas partículas en la íntima de la pared arterial. Las LDL asociadas a proteoglicanos son captadas más eficazmente por los macrófagos, favoreciendo el acumulo de lípidos intracelular y la formación de células espumosas. Por otro lado, las LDL modificadas y retenidas en la matriz extracelular son más susceptibles a la peroxidación lipídica. Los productos liberados por la acción de la sPLA2 como la lisofosfatidilcolina y los ácidos grasos libres, actuarían como mediadores de inflamación contribuyendo a la aterogénesis.

La lisolecitina por sí misma o como producto derivado de la acción de la sPLA₂ sobre las LDL, inhiben la relajación mediada por el NO¹⁵³. La lisolecitina induce la expresión de moléculas de adhesión de monocitos y de células endoteliales permitiendo la invasión de monocitos en el espacio subendotelial y su conversión a macrófagos. La lisolecitina favorece en las células del endotelio la expresión de varios factores de crecimiento (PDGF) y factor de crecimiento endotelial (EGF), dos citocinas que se cree que estimulan la migración y proliferación de células de la musculatura lisa. La lisolecitina estimula la producción de IL-8, una citocina con propiedades quimiotácticas^{131,154}.

1.7. Inflamación y ateroma en la artritis reumatoide

1.7.1. Artritis reumatoide y membrana sinovial

En condiciones normales, la membrana sinovial está formada por dos capas, una superficial (*lining*) o íntima que está en contacto directo con la cavidad intra-articular, y otra denominada subíntima o profunda. La primera posee de una a tres capas de células sinoviales o sinoviocitos que se dividen en dos subpoblaciones; sinoviocitos tipo A, con características de la estirpe monocito-macrófago, y tipo B que poseen características de fibroblasto. Estas células se disponen formando una barrera discontinua entre la luz articular y la subíntima, no existiendo membrana basal.

La subíntima está formada por una matriz de fibras de colágeno tipo I y III, fibronectina y proteoglicanos, con abundante sustancia fundamental. Contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervios, adipocitos y células huésped (macrófagos, fibroblastos y mastocitos).

Estudios histológicos de la membrana sinovial en la AR han podido demostrar un importante infiltrado inflamatorio de células mononucleares (macrófagos y linfocitos), una abundante neovascularización e hiperplasia de la capa superficial o *lining*. El daño articular en la AR, parece iniciarse en el endotelio de la microvasculatura, con edema e infiltración por leucocitos polimorfonucleares de la capa superficial. Posteriormente se desarrolla una red de capilares con obliteración de la microvasculatura, formación de trombos, hiperplasia del "*lining*" y acumulo perivascular de linfocitos. A medida que se crónica la enfermedad, la sinovial se hipertrofia y edematiza, protuyendo hacia la cavidad articular en forma de vellosidades. En el estroma subsinovial aparecen acumulos nodulares de células

mononucleadas (fundamentalmente linfocitos T CD4 de memoria) y células plasmáticas. Entre los nódulos, hay acumulos difusos formados por macrófagos, linfocitos T y B y células plasmáticas. Los macrófagos están activados y las citocinas producidas por ellos (IL-1, IL-6, IL-2, IL-8, TNF- α , TGF- β , GM-CSF, PDGF) se encuentran abundantes en la membrana y líquido sinovial. Estas citocinas inducen proliferación de sinoviocitos y liberación de enzimas (metaloproteasas) y prostaglandinas (principalmente la prostaglandina E2) que ejercen un papel esencial en la destrucción de los tejidos articulares. Algunas de estas citocinas son capaces de activar células del endotelio vascular, con la consiguiente inducción de moléculas de superficie (ICAM, VCAM) que favorecen la adhesión de monocitos, linfocitos y neutrófilos a las células endoteliales. Esta adhesión es imprescindible para el paso posterior de las células circulantes a la matriz extracelular de la membrana sinovial, donde se producen fenómenos de adhesión entre linfocitos y macrófagos con proteínas de la matriz (fibronectina, colágeno) lo cual representa un mecanismo de anclaje de las células al tejido.

La consecuencia de las alteraciones descritas, tanto en la estructura como función de la membrana sinovial, es la persistencia de un proceso inflamatorio, con una proliferación celular masiva, constituyendo un tejido con comportamiento pseudoneoplásico denominado "*pannus*", formado por macrófagos y fibroblastos activados que erosionan el cartílago, hueso, tendones y ligamentos ¹⁵⁵.

1.7.2. Artritis reumatoide y ateromatosis

Existe un nexo de unión entre la AR y aterogénesis, ambas patologías son el resultado de un proceso inflamatorio crónico, en donde uno o varios factores etiopatogénicos no bien conocidos actuarían de forma persistente, la diferencias entre estas enfermedades es el tejido donde asienta la lesión, en la AR principalmente acontece en la membrana sinovial de las articulaciones y en la ateromatosis en la íntima de la pared arterial. Tanto en la patogénesis de la AR como de la ateromatosis intervienen factores genéticos, alteraciones de la respuesta inmunológica, posibles agentes infecciones por virus o bacterias, así como la combinación de éstos u otros factores. La activación de células inflamatorias permiten la degradación de matriz extracelular en las placas de ateroma jugando un papel importante en la desestabilización de las placas. La destrucción articular en la AR es el resultado de la interacción de numerosas células y sustancias inflamatorias. Las citocinas inducen la síntesis de metaloproteasas en los sinoviocitos tipo fibroblastos, lo que produce un aumento de la degradación de la matriz extracelular. En ambas enfermedades se han descrito un aumento de citocinas y moléculas de adhesión (ICAM, VCAM, selectina E). La sPLA2 se ha relacionado con la patogénesis de la AR y con la ateromatosis. Estudios recientes han sugerido que la angiogénesis, importante factor en la patogénesis de la AR, puede contribuir al desarrollo de aterosclerosis. La activación de células T están presentes en las placas de ateroma y en la membrana sinovial de pacientes con AR. En el 65% de los pacientes con angor inestable se han encontrado niveles aumentados de linfocitos T CD4 y CD28. Esta subpoblación de linfocitos fue originariamente descrita en pacientes con AR y ha

sido asociado con manifestaciones extraarticulares de la enfermedad, en particular con vasculitis ¹⁵⁶.

1.7.3. Marcadores de inflamación en la AR y su asociación con la ateromatosis

1.7.3.1. Proteína C reactiva

La proteína C reactiva (PCR) debe su nombre a su capacidad de precipitar con el polisacárido C del neumococo en presencia de calcio. La PCR es una β -globulina que pertenece a la familia de proteínas llamadas pentaxinas, por su estructura cíclica compuesta por 5 subunidades iguales no glicosiladas.

La PCR se une a la fosforil-colina, un constituyente de los fosfolípidos de las membranas celulares, y a las paredes celulares de agentes bacterianos. Además, también puede activar el complemento al unirse a uno de estos ligandos.

Los neutrófilos y monocitos tienen receptores para la PCR mediante los cuales pueden influir en la activación celular y la fagocitosis. Además inhiben la agregación plaquetaria inducida por el PAF, al unirse a éste y a los fosfolípidos de las membranas celulares. Estas acciones sugieren que la PCR tiene un importante papel en el reconocimiento y eliminación de patógenos y en la modulación de la respuesta inflamatoria ¹⁵⁷.

En la AR los mediadores de la inflamación se producen en las articulaciones inflamadas, en el pannus y en los leucocitos infiltrantes. Cuando se producen en

suficientes cantidades alcanzan el plasma y estimulan la síntesis hepática de PCR. Se ha encontrado correlación entre los niveles de PCR en plasma y de IL-6 en el líquido sinovial ¹⁵⁸. La PCR se correlaciona con la inflamación articular y es un marcador de actividad de la enfermedad que se ha relacionado con la progresión de la enfermedad ¹⁵⁹.

En pacientes con IAM se han detectado concentraciones elevadas de PCR, y además, estos niveles se correlacionaban con un mayor riesgo de recidiva de isquemia aguda en pacientes hospitalizados por angor ¹⁶⁰. En varones aparentemente sanos y en pacientes que habían padecido una angina inestable se ha observado que el riesgo de padecer un IAM estaba directamente relacionado con las concentraciones plasmáticas de PCR. Los individuos con PCR en el cuartil más elevado presentaron un riesgo relativo de IAM aproximadamente de 3 veces superior que los individuos que tenían una PCR dentro del cuartil más bajo ¹⁶¹. En otro estudio, realizado en mujeres aparentemente sanas, observaron que marcadores de inflamación como la PCR y el amiloide A eran factores de riesgo de enfermedad cardiovascular ¹⁶². Estudios más recientes continúan demostrando que la PCR es un fuerte marcador de riesgo cardiovascular, incluso superior a las concentraciones plasmáticas de colesterol-LDL. Se ha llegado a sugerir que individuos con niveles de colesterol-LDL normales pero con PCR elevada, se podrían beneficiar de tratamiento farmacológico, incluyendo la terapia con estatinas ^{163,164}.

Por tanto, la PCR es un indicador de inflamación y un marcador muy sensible de enfermedad cardiovascular con un papel importante en la patogénesis de aterosclerosis.

1.7.3.2. Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)

El factor de necrosis tumoral (TNF- α) es una citocina proinflamatoria secretada principalmente por los macrófagos activados, pero también por monocitos, neutrófilos, linfocitos T, granulocitos, células epiteliales y células de musculatura lisa. El TNF- α se sintetiza en forma de una proteína precursora de 26 Kda y 233 aminoácidos ligada a la membrana, y que es transformada por proteólisis en una forma madura de 17 Kda. El péptido es bioactivo como un trímero de 51 Kda, que puede ser reconocido por dos tipos de receptores, el TNFR1 o p55 y el TNFR2 o p75.

Entre los estímulos que inducen la producción de TNF- α en monocitos y macrófagos se encuentran: lipopolisacáridos, ésteres de forbol, citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2) y radicales libres de oxígeno. En monocitos humanos la regulación de su expresión se produce tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Evidencias experimentales sugieren que la vía de la fosfolipasa A2 y la lipooxigenasa pueden estar implicadas en el proceso de inducción a la expresión. El TNF- α contribuye a la necrosis celular local y promueve la angiogénesis. El TNF- α aumenta la fagocitosis y la citotoxicidad en neutrófilos y modula la expresión de otras muchas proteínas como fos, myc, IL-1 y IL-6. El TNF- α es un potente quimiotáctico para los neutrófilos, aumenta su adhesión al endotelio y estimula la mitogénesis en fibroblastos.

El TNF- α es una citocina clave en la patogénesis de la AR. El TNF- α induce la síntesis de otras citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, GM-CSF) y de metaloproteasas en los sinoviocitos tipo fibroblastos, lo que produce un aumento de la degradación de la matriz extracelular. El TNF- α incrementa la producción de

moléculas de adhesión y la síntesis de prostaglandina E2 por los sinoviocitos, lo cual junto con la IL-6, IL-1 y el propio TNF, incrementan y activan los osteoclastos, dando lugar a la destrucción del hueso ¹⁶⁵. En la membrana y líquido sinovial de pacientes con AR se han encontrado niveles de TNF- α elevados, y éstos se correlacionaban positivamente con el grado de sinovitis y de destrucción articular. En modelos animales se ha estudiado cómo el TNF- α media mecanismos implicados en la artritis, mediante la inyección de TNF- α humano modificado en ratones. El resultado fue el desarrollo de una artritis erosiva en ratones transgénicos similar a la que padecen los pacientes con AR ¹⁶⁶. Por ello, en pacientes con AR se han ensayado tratamientos anti- TNF, mediante la administración del receptor soluble p75 del TNF o de anticuerpos monoclonales anti-TNF. Estos tratamientos inhiben la acción del TNF- α , uniéndose e inactivando dicha citocina. Los resultados observados en los diferentes estudios realizados han sido una mejoría en la capacidad funcional y una disminución de parámetros de inflamación (número de articulaciones inflamadas, PCR y VSG), además de frenar la destrucción articular ^{167,168}.

En la aterosclerosis, juntamente con otras citocinas, el TNF- α modula la respuesta inflamatoria ⁹¹. El TNF- α inhibe la síntesis de la lipoproteína lipasa (LPL) suprimiendo el metabolismo lipogénico en los adipocitos. Por inmunohistoquímica se ha identificado en células musculares lisas y células del endotelio de la placa de ateroma ¹⁶⁹. Los macrófagos de placas de ateroma expresan y secretan más TNF- α que los macrófagos que provienen de zonas no afectadas ¹⁷⁰. Los monocitos de pacientes con cardiopatía isquémica tiene aumentada la secreción de TNF- α ¹⁷¹.

1.7.3.3. Moléculas de adhesión: ICAM y VCAM

El endotelio es la primera diana del proceso inflamatorio al estar situado en la interfase del medio vascular y los tejidos; independientemente del agente nocivo, sus células se activan, con los consiguientes cambios funcionales. El endotelio estimulado tiene un papel activo, dirigiendo la migración leucocitaria hacia el foco inflamatorio, desempeñado un papel crucial las moléculas de adhesión celular, además de otros mediadores de la inflamación.

Las moléculas de adhesión son proteínas de membrana que se expresan en la superficie de los leucocitos y de las células endoteliales. Permiten la interacción de las células entre sí y con la matriz extracelular. Existen varias familias de moléculas de adhesión: las selectinas, las integrinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las moléculas de adhesión, VCAM y ICAM, pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas.

A partir de análisis inmunohistoquímico se conoce que ICAM se expresan constitutivamente por el endotelio sano in vivo, mientras que la selectina E y VCAM-1 no aparecen en las células endoteliales normales. Citocinas como el $\text{TNF-}\alpha$ y el interferon gamma ($\text{IFN-}\gamma$) inducen la expresión endotelial de selectina E y VCAM-1, y produce un incremento en la expresión de ICAM-1.

Las selectinas vehiculizan el contacto inicial en las interacciones leucocito-endotelio al participar en el rodamiento o deslizamiento de los leucocitos por el endotelio vascular en lugares de inflamación y daño tisular.

Las integrinas constituyen los principales receptores con los que las células interaccionan con la matriz extracelular, además de participar en interacciones intercelulares. Los linfocitos, macrófagos y eosinófilos utilizan la integrina VLA (very

late activation antigens) para unirse al VCAM-1 del endotelio activado. Las integrinas LFA-1 de los leucocitos interactúan con ICAM de las células endoteliales. Las integrinas activadas y sus contrareceptores intervienen en la adhesión firme de los leucocitos al endotelio vascular y en la migración de leucocitos a través de uniones intercelulares endoteliales. Las interacciones LFA-1/ICAM-1 parecen ser esenciales en la migración a través del endotelio ^{172,173}.

Las moléculas de adhesión juegan un papel importante en la migración de células inflamatorias hacia la membrana sinovial. Estudios inmunohistoquímicos muestran la existencia de ICAM-1 en los macrófagos, fibroblastos y células endoteliales de la membrana sinovial. Cultivos de sinoviocitos tipo B (similares a fibroblastos) expresan de forma constitutiva ICAM-1, cuya concentración puede aumentar por estímulo de distintas citocinas, como el TNF- α , el IFN- γ y la IL-1. Uno de los ligandos de la ICAM se encuentra en las células T pudiendo facilitar la migración y retención de linfocitos T en la membrana sinovial.

Otras moléculas de adhesión de gran interés en la AR, son la selectina E y VCAM, ambas se expresan en las células endoteliales activadas y actúan como potentes mediadores de la angiogénesis. Las VCAM están presentes en células endoteliales y en los macrófagos de la subíntima de la membrana sinovial ¹⁷⁴.

En la ateromatosis, la adhesión de leucocitos al endotelio vascular y la consecuente migración al espacio subendotelial ha sido considerada como un paso importante en el inicio de la aterosclerosis ⁹¹. En parte, dicho proceso se halla mediado por moléculas de adhesión celular expresadas en el endotelio vascular como respuesta a mediadores de inflamación, tales como IL-1, TNF- α y IFN- γ . Estudios e investigaciones han demostrado la existencia de niveles aumentados de moléculas

de adhesión en placas de ateroma ¹⁷⁵. Por otro lado, niveles aumentados de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM y selectina E) se han asociado a un mayor riesgo de IAM ¹⁷⁶.

1.7.3.4. Interferon gamma (IFN- γ)

Los interferones comprenden un grupo de proteínas que fueron originariamente reconocidos por su capacidad de proteger a las células frente acciones virales. La producción de interferon está regulada por diferentes estímulos. Los estímulos más frecuentes inductores del IFN alfa y beta son los virus, bacterias y el RNA de doble cadena. El IFN-alfa es inducido más eficazmente por células mononucleares y el beta por fibroblastos y células epiteliales. El IFN- γ producido por linfocitos T es inducido por mitógenos y antígenos.

Se han descrito dos subpoblaciones de células T helper CD4 (Th) en función de las citocinas que producen. Los Th1 que secretan IL-2, IFN- γ , que colaborarían preferentemente en la expansión clonal y la citotoxicidad celular. Los Th2 que secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, más relacionados con la producción de inmunoglobulinas y con la memoria inmunológica.

Funciones del IFN- γ

- Activa los monocitos-macrófagos con funciones microbidas y antitumorales
- Activa el paso de células T citotóxicas a células natural Killer o NK
- Aumenta la respuesta de las células B y la citotoxicidad mediada por autoanticuerpos.

- Activa la expresión de antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad tipo I y II (HLA-DR).
- Modulan la respuesta inmune de células T dependientes o no de la síntesis de anticuerpos.

En pacientes con AR se ha observado un desequilibrio entre linfocitos Th1/Th2 con predominio de la subpoblación de linfocitos CD4 Th1 en zonas de inflamación sinovial y en sangre periférica. El desequilibrio entre Th1 y Th2 parece ser crucial en el desarrollo de la enfermedad. Numerosos estudios han demostrado que las células Th1 median la respuesta autoinmunitaria, jugando un papel importante en la patogenia de la AR. En pacientes con AR, el aumento en la relación Th1/Th2 en los linfocitos de la membrana sinovial se ha asociado a parámetros clínicos de actividad de la enfermedad, a la intensidad de la hiperplasia en la íntima y al infiltrado linfocitario en la sinovial de la AR ¹⁷⁷.

En la ateromatosis, el estímulo inflamatorio lleva a la diferenciación de monocitos a macrófagos cuya función es la de bloquear la noxa. En este proceso los macrófagos se activan y entre otras acciones expresan antígenos del HLA-DR, lo que permite la presentación de antígenos a los linfocitos T.

La presencia en prácticamente todas las etapas de la ateromatosis de linfocitos T CD4 y CD8 está clara. Los linfocitos activados producen citocinas, entre ellas el IFN- γ , lo que va a multiplicar la respuesta inflamatoria. Además, se ha observado que el IFN- γ inhibe la proliferación de matriz extracelular y la producción de colágeno lo que contribuye a la formación de la placa vulnerable ⁹³.

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La actividad inflamatoria de los pacientes con artritis reumatoide induce cambios cualitativos en las partículas lipoproteicas mediados por acciones enzimáticas de la sPLA2-IIA y oxidativas que derivan en lipoproteínas más aterogénicas.

2.2. Objetivos

- Investigar si los pacientes con AR presentan un perfil lipídico más aterogénico en comparación con un grupo control.
- Investigar si las LDL de los pacientes con AR tienen una mayor afinidad por la matriz extravascular en comparación con el grupo control.
- Relacionar la concentración de sPLA2-IIA con la composición de lipoproteínas y su tendencia a unirse a la matriz extracelular.
- Investigar si los pacientes con AR presentan niveles plasmáticos de marcadores de inflamación, tales como moléculas de adhesión (VCAM, ICAM), fibrinógeno y PCR, más elevados que los individuos de un grupo control.
- Estudiar si los pacientes con AR presentan parámetros de oxidación lipídica más aterogénicos en comparación con un grupo control.
- Relacionar vitaminas antioxidantes con la concentración de sPLA2-IIA y otros marcadores de inflamación en pacientes con AR.

3. PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. Pacientes

La muestra de pacientes con AR y el número de individuos del grupo control se detalla en los artículos publicados.

3.1.1. Pacientes con artritis reumatoide

La población de estudio incluyó a pacientes que cumplieran criterios diagnósticos del American College of Rheumatology (ACR) de artritis reumatoide ¹⁷⁸ con edades comprendidas entre los 24 y 70 años procedentes de consultas externas del Hospital del Mar y de la Esperanza.

Las siguientes situaciones fueron determinantes de exclusión del estudio:

- Enfermedades agudas intercurrentes
- Insuficiencia renal crónica (creatinina sérica superior a 1,5 mg/dl)
- Antecedentes patológicos de hepatopatía, neoplasia o diabetes *mellitus*. También se excluyó a individuos con antecedentes de enfermedad cardiovascular: accidente cerebrovascular (AVC), enfermedad venosa periférica (EVP) y cardiopatía isquémica (CI) conocida a través de la historia clínica
- Administración de fármacos hipolipemiantes en el momento del estudio

3.1.2. Evaluación de la actividad de la enfermedad

La actividad de la AR se determinó siguiendo los criterios de la ACR. Estos criterios de actividad incluyen: el número de articulaciones inflamadas, el número de

articulaciones con dolor a la presión, la discapacidad funcional del paciente valorado a través del cuestionario de salud Health Assessment Questionnaire (HAQ), la escala analógica del dolor (cm), la evaluación global de la actividad de la enfermedad por el médico y por el paciente (cm) y PCR o VSG ¹⁷⁹.

3.1.3. Población de referencia

El grupo control incluyó a pacientes controlados en consultas externas de dicho hospital con artrosis e individuos sanos similares en edad y sexo al grupo afecto de AR. Los individuos de este grupo fueron seleccionados atendiendo a los criterios de inclusión y exclusión del estudio previamente mencionados.

3.1.4. Estudio clínico

Los pacientes con AR y los controles fueron citados y visitados entre el periodo de junio a diciembre de 1998 en consultas externas del Hospital del Mar. El mismo día de la visita médica, primero se realizó la extracción de sangre y posteriormente se visitó al paciente, siempre por el mismo médico y entre las 9 y 12 horas de la mañana. En la visita médica se informó al paciente del objetivo del estudio y se recogieron los antecedentes familiares y patológicos, diagnóstico, tratamiento actual y exploración física que incluyó talla, peso, tensión arterial y exploración física por aparatos.

Además, en los pacientes con AR se recogieron datos relacionados con la enfermedad:

- Años de evolución de la AR
- Duración de la rigidez matutina en minutos
- Escala analógica de dolor (de 0 a 10 cm)
- Número de articulaciones inflamadas según la ACR
- Número de articulaciones con dolor a la presión según la ACR
- Evaluación global de la enfermedad por el paciente (escala de 0 a 10 cm)
- Evaluación global de la enfermedad por el médico (escala de 0 a 10 cm)
- Cuestionario de salud (HAQ), puntuación de 0 al 3¹⁸⁰
- Se valoró la presencia de erosiones en radiografías de manos y pies recientes (menos de 6 meses).

Tanto a los individuos del grupo control como con artritis reumatoide se les realizó el mismo día de la visita una analítica general que incluyó glicemia, perfil renal y hepático, hormonas tiroideas, hemograma, PCR, VSG y fibrinógeno. El factor reumatoide (FR) se determinó en pacientes afectados de AR.

3.2. Métodos de laboratorio

La extracción de sangre se realizó en ayunas de 12 horas. Las muestras de sangre para determinar el perfil lipídico se recogieron en tubos de 10 ml con EDTA (1 mg/mL) e inmediatamente se centrifugaron a 2000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Una vez centrifugado el plasma se transfirió a un tubo de plástico (Greiner) con 10 μ M BHT (antioxidante) y 6 mg/mL de sacarosa (crioprotector) y posteriormente se congelaron a -80°C (Rumsey).

3.2.1. Perfil lipídico:

Los lípidos totales en plasma y la distribución de las distintas subfracciones de lipoproteínas fueron analizados por resonancia magnética nuclear (RMN), la cual permite la cuantificación simultánea de un gran número de subclases lipoproteicas, del contenido lipídico y del tamaño de las partículas (RNM LipoProfile). Las subfracciones lipoproteicas cuantificadas por el método de RMN se muestran a continuación. Se utilizó una nomenclatura de referencia para cada tipo y tamaño de lipoproteína. Se calculó el rango del diámetro de las subfracciones de lipoproteínas por microscopía electrónica para las subfracciones VLDL y LDL. Las HDL se determinaron utilizando un gel de poliacrilamida por gradiente de electroforesis.

Quilomicrones/VLDL subfracciones	IDL/LDL subfracciones	HDL subfracciones
Quilomicrones >200nm	IDL: 25±2 nm	H5 (HDL _{2b}): 11,5±1,5 nm
V6: 150±70 nm	L3: 22±0,7 nm	H4 (HDL _{2a}): 9,4±0,6 nm
V5: 70±10 nm	L2: 20,5±0,7 nm	H3 (HDL _{3a}): 8,5±0,3 nm
V4: 50±10 nm	L1: 19±0,7 nm	H2 (HDL _{3b}): 8,0±0,2 nm
V3: 38±3 nm		H1 (HDL _{3c}): 7,5±0,2 nm
V2: 33±2 nm		
V1: 29±2 nm		

Para la determinación cuantitativa de la Lp(a) se utilizó el SPQ test system (DiaSorin) adaptado al autoanalizador Cobas Mira, que cuantifica la Lp(a) (mg/dL) mediante inmunoprecipitación.

3.2.2. Estudio de la oxidación lipídica

3.2.2.1. Oxidación lipídica de las LDL

Separación de lipoproteínas: Las partículas lipoproteicas utilizadas en el estudio de oxidación lipídica se obtuvieron por el método de ultracentrifugación secuencial preparativa ¹⁸¹. Este método se basa en la diferente flotabilidad que tienen las partículas lipoproteicas sometidas a una fuerza centrífuga. La separación se realizó en una centrífuga modelo Teknicon -1055 y un rotor Kontron T45.6 (Kontron, Suiza). Se utilizaron tubos de polihalómero de una capacidad de 6 mL.

La lipoproteína utilizada en el estudio de oxidación lipídica fue la LDL, la cual se aisló siguiendo el siguiente protocolo:

1.- Aislamiento de VLDL más IDL. Inicialmente se aislaron las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), para ello se depositaron en un tubo de 2 mL de solución de densidad 1.006 g/mL y 1 mL de 1.070 g/mL. Se centrifugaron a 37.000 rpm, a 4°C durante 20 horas. Transcurrido este tiempo se recogieron 2 mL del sobrenadado correspondiente a las VLDL más IDL.

2.- Aislamiento de LDL (1.019-1.063 g/mL). A los 3 mL del infranadado se le añadió 1 mL de solución 1.019 g/mL más 1 mL de solución 1.239 g/mL para obtener una densidad media de 1.063 g/mL. Se centrifugó en las mismas

condiciones anteriores y se recogieron 2 mL del sobrenadado correspondiente a las LDL.

Susceptibilidad de las LDL a la oxidación por hemina:

Preparación de la muestra: Previamente a la oxidación *in vitro* de las LDL, se desalaron y se eliminó el EDTA mediante la filtración de las muestras en columnas PD10 que contienen Sephadex G-25 M (Amersham Pharmacia). Las muestras se equilibraron con tampón PBS (tampón fosfato salino, 10 mM, pH 7.4, 0.15 M NaCl).

Formación de dienos conjugados

Para estudiar la susceptibilidad a la oxidación de las LDL se ha utilizado la cinética de formación de dienos conjugados inducida por hemina según el método descrito por Camejo et al ¹¹³. La hemina es un producto de la degradación de la hemoglobina que se puede unir y oxidar a las lipoproteínas. La cinética de oxidación de las LDL (0.1 mg de apoB/mL) se llevó a cabo monitorizando el cambio de absorbancia a 250 nm a 30°C con un espectrofotómetro UV (Uvikon 922, Kontron) en presencia de hemina (2.5 μ M) y H₂O₂ (10 μ M) durante 4 horas.

La oxidación de las LDL en presencia de hemina se divide en tres fases temporales consecutivas que resultan de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) a hidróxidos lipídicos cuando los dobles enlaces entre átomos de carbono se convierten en dobles enlaces conjugados (dienes) con una absorción a 250 nm.

De las curvas de oxidación se determinaron los siguientes parámetros:

1. *Lag phase* o fase de latencia (LP): Se define como el intervalo en minutos entre la intersección de la línea recta definida por la pendiente de la curva con la absorbancia inicial. En esta fase se produce el consumo de antioxidantes de la partícula lipoproteica. Cuanto mayor sea el tiempo de esta fase, más resistente a la oxidación será la lipoproteína.
2. *Maximal rate* (MR). Una vez consumidos los antioxidantes se inicia la fase de propagación en la se oxidan todos los PUFAS presentes en la lipoproteína mediante una reacción en cadena. Esta fase permite calcular la tasa de oxidación (MR) expresada en mol de dienos/mol de LDL teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar de los dienos conjugados ($\epsilon_{250}=29500$ L / mol. cm).
3. *Maximum diene production* (MDP). Una vez se han oxidado todos los PUFAS empieza la fase de descomposición en la que se generan los productos finales de la oxidación lipídica (aldehídos, ...). De esta fase se obtiene la máxima producción de dienos expresada en mol de dienos /mol LDL (MDP).

3.2.2.2. Determinación de vitamina E

Se determinó vitamina E en plasma mediante HPLC. Para su análisis las muestras se protegieron de la luz y del oxígeno.

Extracción de vitamina E

1. En un tubo Eppendorf se depositó 100 μ L de plasma más 100 μ L de una solución etanólica de acetato de α -tocoferol (45 μ g/mL) como estándar interno. La misión del estándar interno es evaluar la pérdida de vitamina E que se

produce durante el proceso de extracción. Se mezcló enérgicamente durante 15 segundos.

2. Se añadió 300 μ L de n-héxano y los tubos se mantuvieron en agitación constante durante 30 minutos.
3. Los tubos se centrifugaron en una micro-centrífuga durante 5 minutos para separar la fase superior (héxano) de la fase inferior (agua-etanol).
4. Se transfirió la fase superior de héxano que contiene α -tocoferol y el acetato de α -tocoferol en otro tubo y se secó bajo un flujo de nitrógeno.
5. Inmediatamente antes de inyectar la muestra en HPLC se reconstituyó con 100 μ L de etanol.
6. Se inyectó 20 μ L de la muestra a la columna.

Condiciones del HPLC

Bombas y controlador	Hewlett Packard, serie 1050
Columna	Spherisorb-ODS 2, 125 x 4 mm, 5 μ
Fase móvil	Metanol (100%)
Flujo	1 mL/minuto
Detección	292 nm (o Ex 288, Em 340)
Tiempo de retención	5 minutos para el α -tocoferol 6 minutos para el acetato de α -tocoferol
Cálculo	La concentración de vitamina E se determinó extrapolando el área del pico con una curva estándar de α -tocoferol (1 μ g/mL-25 μ g/mL), se corrigió por el estándar interno teniendo en cuenta en factor de dilución.

3.2.2.3. Determinación de vitamina A

Se determinó la vitamina A del plasma mediante HPLC. Para su análisis, las muestras se protegieron de la luz y oxígeno.

Extracción de vitamina A

1. Se transfirió 100 μ L de plasma en un tubo Eppendorf (1.5mL).
2. Se añadió 100 μ L de una solución de etanol de all-trans-retinyl acetate (1 μ g/mL) como estándar interno. Se mezcló enérgicamente durante 15 segundos.
3. Se depositó 200 μ L de n-hexano dentro del tubo Eppendorf. Se mezcló durante 30 segundos y se colocaron los tubos en un roller durante 30 minutos.
4. Se centrifugaron durante 5 minutos en una micro-centrífuga para separar la capa superior de hexano de la capa inferior de etanol-acuosa.
5. Se transfirió la capa superior que contiene el retinol y el acetato de retinol en un Eppendorf nuevo y se secó bajo un flujo de nitrógeno.
6. Inmediatamente antes de inyectar la muestra al HPLC, se reconstituyó el residuo lipídico en 100 μ L de etanol y se mezcló ligeramente con un vórtex.
7. Se inyectó 20 μ L a la columna del HPLC.

Condiciones del HPLC

Bombas y controlador	Hewlett Packard, serie 1050
Columna	Spherisorb-ODS 2, 125 x 4 mm, 5 μ
Fase móvil	Metanol (98%)
Flujo	1 mL/minuto
Detección	325 nm (o Ex 288, Em 340)
Tiempo de retención	5 minutos para el retinol 6 minutos para el acetato de retinol
Cálculo	La concentración de vitamina A se determinó extrapolando el área del pico con una curva estándar de retinol (1 μ g/mL-25 μ g/mL), se corrigió por el estándar interno teniendo en cuenta en factor de dilución.

3.2.3. Interacción entre las LDL y el condroitín-6-sulfato (C6S)

La interacción entre las LDL y el condroitín-6-sulfato (C6S) glucosaminoglicano (GAG) (Seikagaku, Tokio, Japan) se realizó utilizando el método de EMSA (Electrophoretic mobility shift assay). Esta técnica se basa en la observación de que el movimiento de GAG sulfatado a través del gel de agarosa no desnaturizante es dificultado cuando las partículas de LDL están unidas a él. Después de la electroforesis de la solución que contiene LDL o LDL y GAG, es posible detectar bandas correspondientes a la migración de complejos, así como aquellos con GAG libre. Este método tiene dos ventajas comparado con otros métodos: el GAG y las LDL están libres en solución y no necesitan ser inmovilizadas en cualquier superficie, evitándose modificaciones innecesarias, y por otro lado, este método requiere pequeñas cantidades de GAG y LDL.

3.2.4. Marcadores de inflamación

Los niveles en plasma de sPLA₂-IIA se analizaron utilizando el método ELISA con un anticuerpo monoclonal (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) para la unión, y un anticuerpo policlonal con detección colorimétrica.

Las moléculas de adhesión (VCAM, ICAM), TNF- α y TNF- γ se determinaron por ELISA utilizando el Kit R&D SYSTEMS Europe, Ltd.

El método de ELISA utilizado se basa en una técnica inmunoenzimática cuantitativa de tipo sándwich. El Kit proporciona una placa de pozos en las que hay adherido un anticuerpo monoclonal contra el marcador de inflamación estudiado. En cada pozo se añade concentraciones conocidas de un estándar

(citocinas humanas) y las muestras (medio de cultivo), de manera que el marcador de inflamación se unirá al anticuerpo inmovilizado. Después de un lavado de los pozos para eliminar las proteínas de la muestra que no se unieron, se le añadió un anticuerpo policlonal específico para cada uno de los marcadores de inflamación. Tras un nuevo lavado para eliminar el exceso de reactivo, se añadió una solución de sustrato de manera que desarrolló color proporcionalmente a la cantidad del marcador de inflamación que se había unido en el primer paso. Finalmente se paró la reacción colorimétrica y se midió la intensidad de color en un lector para placas de ELISA. Comparando la densidad óptica de las muestras y la de las curvas estándar se determinó la concentración de cada marcador de inflamación.

Se determinó la PCR (mg/L) utilizando el Kit Beckman Synchron CX7 y la VSG por el método de Westergren.

Para el análisis de otros parámetros de laboratorio, tales como: glicemia, urea, creatinina, GOT se utilizó el Kit comercial Beckman Synchron CX7. El factor reumatoide (FR) se determinó por inmunoturbidimetria utilizando el Kit de BM/ Hitachi 704/717/911.

3.3. Estadística

Para comparar las medias de pacientes y controles se utilizó el test de U Mann-Whitney. Para determinar la asociación lineal entre dos variables se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson para variables paramétricos y de Spearman para variables no paramétricas. El valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo. Se utilizó el programa SPSS 8.0.

4.- RESULTADOS

- 4.1. Revisión: Mortalidad global y por enfermedad cardiovascular. Paredes S, Masana L. *Clin Invest Arteriosclerosis* 2001; 13: 70-79.

- 4.2. Elevated levels of small, low-density lipoprotein with high affinity for arterial matrix components in patients with rheumatoid arthritis. Possible contribution of phospholipase A2 to this atherogenic profile. Hurt-Camejo E, Paredes S, Masana L, Camejo G, Sartipy P, Rosengren B, Pedreño J, Vallvé JC, Benito P, Wiklund. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2761-2767.

- 4.3. Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis: Association with inflammatory markers. Paredes S, Girona J, Hurt-Camejo E, Vallvé JC, Olivé S, Heras M, Benito P, Masana L. *J Rheumatol* 2002; 29: 2271-2277.

5.-DISCUSIÓN

En la actualidad, está bien establecido que la AR reduce no sólo la calidad de vida sino también la cantidad de vida. Un gran número de estudios poblacionales han demostrado que los pacientes con AR presentan una expectativa de vida reducida y un exceso de mortalidad en comparación con la población general.

La ECV constituye la primera causa de muerte en pacientes con AR, llegando a suponer en algunos trabajos más de la mitad del total de las muertes. La mortalidad por ECV es superior en estos pacientes que en la población general. Dentro de las causas de muerte por ECV, la cardiopatía isquémica es la más frecuente.

La elevada mortalidad por ECV en pacientes con AR ha llevado, incluso, a considerar a esta enfermedad como un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular.

Recientemente, se ha observado en pacientes con AR tratados con fármacos modificadores de la enfermedad durante al menos 5 años, un mayor grosor de la carótida derecha y un mayor número de placas de ateroma, en relación a controles sin AR. La edad en el momento del estudio y la duración de la enfermedad fueron los mejores factores predictivos del desarrollo de enfermedad arteriosclerótica¹⁸².

Los mecanismos de este aumento de morbi-mortalidad por ECV no son bien conocidos, pero parece que la respuesta inflamatoria de la AR podría favorecer una acelerada aterogénesis.

En estudios previos en pacientes con AR se han observado alteraciones del perfil lipídico, caracterizadas por una disminución de los niveles en plasma de colesterol y de lipoproteínas, tanto LDL como HDL. Las bajas concentraciones de HDL se han relacionado con un mayor riesgo de aterosclerosis, aunque la disminución

concomitante de LDL hace que este perfil lipoproteico cuantitativamente no comporte un mayor riesgo de aterogénesis.

En pacientes con AR no se han estudiado las alteraciones cualitativas del perfil lipídico.

A partir de estos conocimientos y teniendo en cuenta que tanto la aterogénesis como la AR son el resultado de un proceso inflamatorio crónico, nos planteamos investigar en pacientes con AR la presencia de lipoproteínas cualitativamente más aterogénicas y de marcadores de inflamación elevados que se han asociado a un mayor riesgo de ECV, con la finalidad de poder contribuir a explicar esta elevada mortalidad por enfermedad cardiovascular en pacientes con AR.

En los trabajos expuestos en el apartado de resultados hemos evaluado parámetros que influyen en el proceso de la ateromatosis. Dichos parámetros han sido: marcadores de inflamación, entre ellos la sPLA2-IIA y la PCR, las subclases de lipoproteínas plasmáticas, la afinidad de las LDL por los glucosaminoglicanos; y el estudio de la oxidación lipídica mediante la cinética de formación de dienos conjugados y la determinación de antioxidantes (vitamina E y vitamina A).

A continuación se discuten los resultados de los artículos que se han incluido en esta memoria.

Artículo 2: Elevated levels of small, low-density lipoprotein with high affinity for arterial matrix components in patients with rheumatoid arthritis. Possible contribution of phospholipase A2 to this atherogenic profile.

Los resultados de este estudio muestran que los pacientes con AR presentan concentraciones en plasma de sPLA2-IIA y PCR más elevadas que el grupo control. Las concentraciones en plasma de otros marcadores de inflamación (ICAM, fibrinógeno, TNF- α , IFN- γ y VSG), también fueron significativamente más altas en el grupo de pacientes con AR que en el grupo control.

Además, en pacientes con AR encontramos niveles en plasma más altos de lipoproteínas LDL densas y pequeñas en comparación con el grupo control. Las LDL densas y pequeñas presentan una mayor aterogenicidad debido a su facilidad para atravesar el endotelio vascular y a que tienen una mayor afinidad por los proteoglicanos de la pared arterial. En nuestro estudio, el aumento de los niveles de LDL densas y pequeñas en los pacientes con AR estaba asociado a una mayor afinidad de la LDL por los glucosaminoglicanos. Por otro lado, en los pacientes con AR observamos una correlación positiva entre los niveles de sPLA2-IIA y las LDL densas y pequeñas. Estos resultados sugieren que los niveles elevados de sPLA2-IIA darían lugar a unas lipoproteínas modificadas con una elevada aterogenicidad y que debido a la alta afinidad que presentan para unirse a los glucosaminoglicanos de la matriz extracelular, serían más ávidamente captadas por los macrófagos favoreciendo la formación de células espumosas y el proceso de la ateromatosis.

Estas observaciones confirman la hipótesis que el estado de inflamación crónica en los pacientes con AR induce cambios cualitativos en las lipoproteínas plasmáticas, a través de la acción hidrolítica de la sPLA2-IIA, dando lugar a un perfil de lipoproteínas más aterogénico.

Este perfil lipoproteico junto con la presencia de marcadores de inflamación elevados, tales como la PCR y la sPLA2-IIA, podrían contribuir a explicar el aumento de mortalidad descrito por enfermedad cardiovascular en pacientes con AR.

Artículo 3: Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis: Association with inflammatory markers.

La peroxidación lipídica juega un papel importante en la inflamación y en la aterogénesis. En pacientes con AR, estudios anteriores muestran aumento de niveles en plasma y en líquido sinovial de productos derivados de la oxidación lipídica, con resultados contradictorios en las concentraciones de vitaminas antioxidantes.

En este trabajo nos centramos en estudiar si la inflamación puede influir en las vitaminas antioxidantes. Además, investigamos si las LDL de los pacientes con AR son más susceptibles a las modificaciones oxidativas en comparación con un grupo control.

Los resultados obtenidos mostraron una correlación inversa entre vitaminas antioxidantes (vitamina A y vitamina E) y marcadores de inflamación como la sPLA2-IIA y la PCR. Estos resultados apoyarían la hipótesis que la inflamación crónica afecta los niveles de vitaminas antioxidantes en pacientes con AR.

Además, encontramos una correlación positiva entre la constante de afinidad de la LDL por el condroitín 6-sulfato (Kd-LDL) y la *lag phase* en la cinética de formación de dienos conjugados en pacientes con AR. Esto sugiere que las LDL de los pacientes con AR tienen dos propiedades pro-aterogénicas: una mayor interacción con la pared arterial, y por otro lado una mayor susceptibilidad a la oxidación que las LDL del grupo control, en la que no se observó esta correlación entre la Kd-LDL y la *lag phase*.

Inesperadamente, no encontramos diferencias significativas entre las distintas fases de dienos conjugados y vitaminas antioxidantes entre pacientes con AR y el grupo control. Esto podría explicarse por el hecho de que los pacientes con AR estaban bajo tratamiento antiinflamatorio y con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad. El estudio se llevó cabo en pacientes con AR en tratamiento por ser ésta la situación real que se ha asociado a incremento de mortalidad por enfermedad cardiovascular.

6.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En nuestros estudios, los pacientes con AR y el grupo control presentaron concentraciones en plasma similares de colesterol, triglicéridos, ApoA-I, ApoB, VLDL y HDL. En los pacientes con AR, los niveles de LDL fueron más bajos que los del grupo control.

Los niveles de LDL densas y pequeñas fueron más elevados en pacientes con AR que en el grupo control.

La afinidad de la LDL por el condroitín 6-sulfato, GAG, fue significativamente más alta en pacientes con AR que en el grupo control.

En los pacientes con AR se observó una correlación positiva entre la afinidad por GAG y los niveles de LDL densas y pequeñas en plasma.

Los pacientes con AR presentaron concentraciones en plasma significativamente más elevadas de sPLA2-IIA y de otros marcadores de inflamación (ICAM, PCR, TNF- α , IFN- γ y fibrinógeno) que el grupo control.

En pacientes con AR encontramos una correlación positiva entre marcadores de inflamación tales como la sPLA2-IIA y la PCR y las LDL densas y pequeñas.

Los pacientes con AR presentaron niveles más bajos de vitamina A y similares de vitamina E en comparación con el grupo control, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

En pacientes con AR observamos una correlación inversa entre las vitaminas A y E y la sPLA2-IIA.

Los parámetros oxidativos, medidos a través de la formación de dienos conjugados, fueron similares en pacientes con AR y el grupo control.

7.- BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Mulero J, Contreras M A, Barbadillo C, Andréu JL. Epidemiología y factores etiológicos en la AR. Rev Clin Esp 2000; 200:14-19.
2. Valverde V, Hernández C, Carmona L. Estudio EPISER. Prevalencia e impacto de las enfermedades reumáticas en la población adulta española. Madrid 2001; Capítulo IV, 53-60.
3. McDuffie FC. Morbidity impact of rheumatoid arthritis on society. Am J Med 1985; 78 (1A): 1-5.
4. Markenson JA. Worldwide trends in the socio-economic impact and long-term prognosis of rheumatoid arthritis. Semin Arthritis Rheum 1991; 21 (2 Suppl 1): 4-12.
5. Cobbs S, Anderson F, Bauer W. Length of life and cause of death in rheumatoid arthritis. N Engl J Med 1953; 249: 553-556.
6. Bywaters E, Curwen M, Dresner E, Dixon A. Ten years follow-up of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1961; 20: 198-199.
7. Duthie J, Brown P, Truelove L, Baragar F, Lawrie A. Course and prognosis in rheumatoid arthritis: a further report. Ann Rheum Dis 1964; 23: 193-204.
8. Moesmann G. Malignancy and mortality in subacute rheumatoid arthritis in old age. Acta Rheuma Scand 1969; 15: 193-199.
9. Uddin J, Kraus A, Kelly H. Survivorship and death in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1970; 13: 125-130.
10. Isomäki H, Mutru O, Koota K. Death rate and causes of death in patients with rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol 1975; 4: 205-208.
11. Koota K , Isomäki H, Mutru O. Death rate and causes of death in RA patients during a period of five years. Scand J Rheumatol 1977; 6: 241-244.
12. Rasker J, Cosh J. Cause and age at death in a prospective study of 100 patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1981; 40: 115-120.
13. Allebeck P. Increased mortality in rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol 1982; 11: 81-86.
14. Prior P, Symmons D, Scott D, Brown R, Hawkins C. Cause of death in rheumatoid arthritis. Br J Rheumatol 1984; 23: 92-99.

15. Vandenbroucke J, Hazevoet H, Cats A. Survival and cause of death in rheumatoid arthritis: a 25 year prospective follow-up. *J Rheumatol* 1984; 11: 158-161.
16. Mutru O, Laakso M, Isomäki H, Koota K. Ten year mortality and causes of death in patients with rheumatoid arthritis. *BMJ* 1985; 290: 1797-1799.
17. Fries J, Bloch D, Spitz P, Mitchell D. Cancer in rheumatoid arthritis: a prospective long-term study of mortality. *Am J Med* 1985; 78: 56-59.
18. Mitchell D, Spitz P, Young D, Bloch D, McShane D, Fries J. Survival, prognosis, and causes of death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 706-714.
19. Scott D, Symmons D, Coulton B, Popert A. Long-term outcome of treating rheumatoid arthritis: results after 20 years. *Lancet* 1987; i: 1108-1111.
20. Reilly P, Cosh J, Maddison P, Rasker J, Silman A. Mortality and survival in rheumatoid arthritis: a 25 years prospective study of 100 patients. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 363-369.
21. Jacobsson L, Knowler W, Pillemar S, Hanson RL, Pettitt DJ, Nelson RG, Del Puente A, McCance DR, Charles MA, Bennett PH. Rheumatoid arthritis and mortality: A longitudinal study in Pima Indians. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1045-1053.
22. Wolfe F, Mitchell D, Sibley J, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Spitz PW, Haga M, Kleinheksel SM, Cathey MA. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 481-494.
23. Pincus T, Brooks R, Callahan L. Prediction of long-term mortality in patients with rheumatoid arthritis according to simple questionnaires and joint count measures. *Ann Intern Med* 1994; 120: 26-34.
24. Myllykangas-Luosujärvi R, Aho K, Kautiainen H, Isomäki H. Cardiovascular mortality in women with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995; 22: 1065-1067.
25. Wallberg-Jonsson S, Öhman M, Dahlqvist S. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden. *J Rheumatol* 1997; 24: 445-451.
26. Symmons D, Jones M, Scott D, Prior P. Long-term mortality outcome in patients with rheumatoid arthritis: early presenters continue to do well. *J Rheumatol* 1998; 25: 1072-1077.

27. Riise T, Jacobsen BK, Gran JT, Haga HJ, Arnesen E. Total mortality is increased in rheumatoid arthritis. A 17 years prospective study. *Clin Rheumatol* 2001; 20(2): 123-127.
28. Chehata JC, Hassell AB, Clarke SA, Matthey DL, Jones MA, Jones I, Dawes PT. Mortality in rheumatoid arthritis: relationship to single and composite measures of disease activity. *Rheumatology* 2001; 40: 447-452.
29. Yelin E, Trupin L, Wong B, Rush S. The impact of functional status and changes in functional status on mortality over 18 years among persons with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29: 1851-1857.
30. Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, O'Fallon WM, Matteson EL. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 54-58.
31. Martinez MS, Garcia-Monforte A, Rivera J. Survival study of rheumatoid arthritis patients in Madrid. A 9 year prospective follow-up. *Scand J Rheumatol* 2001; 30: 195-198.
32. Linos A, Worthington J, O'Fallon W, Kurland L. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota: a study of incidence, prevalence and mortality. *Am J Epidemiol* 1980; 111: 87-98.
33. Lindqvist E, Eberhardt K. Mortality in rheumatoid arthritis patients with disease onset in the 1980. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 11-14.
34. Gabriel S, Crowson C, O'Fallon M. Mortality in rheumatoid arthritis: Have we made an impact in 4 decades?. *J Rheumatol* 1999; 26: 2529- 2533.
35. Kazis L, Anderson J, Meenan R. Health status as a predictor of mortality in rheumatoid arthritis: a five year study. *J Rheumatol* 1990; 17: 609-613.
36. Leigh J, Fries J. Mortality predictors among 263 patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1991; 18: 1307-1312.
37. Lehtinen K, Isomäki H. Intramuscular gold therapy is associated with long survival in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1991; 18: 524-529.
38. Pincus T, Callahan L. Rheumatology function tests: grip strength, walking time, button test and questionnaires document and predict long-term morbidity and mortality in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1992; 19: 1051-1057.

39. Suzuki A, Ohosone Y, Obana M, Obana M, Mita S, Matsuoka Y, Irimajiri S, Fukuda J. Cause of death in 81 autopsied patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994; 21: 33-36.
40. Erhardt C, Mumford P, Venables P, Maini R. Factors predicting a poor life prognosis in rheumatoid arthritis: an eight year prospective study. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 7-13.
41. Allebeck P, Rodvall Y, Allander E. Mortality in rheumatoid arthritis, particular as regards drug use. *Scand J Rheumatol* 1985; 14: 102-108.
42. Walleberg-Jonsson S, Johansson H, Öhman ML, Rantapää-Dalhlqvist S. Extent of inflammation predicts cardiovascular disease and overall mortality in seropositive rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26: 2562-2571.
43. Turesson C, O'Fallon WM, Crowson CS, Gabriel SE. Occurrence of extraarticular disease manifestations is associated with excess mortality in community based cohort of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002;29:62-67.
44. McDougall R, Sibley J, Haga M, Russell A. Outcome in patients with rheumatoid arthritis receiving prednisone compared to matched controls. *J Rheumatol* 1994; 21: 1207-1213.
45. Krause D, Shleusser B, Herborn G, Rau R. Response to methotrexate treatment is associated with reduced mortality in patients with severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 14-21.
46. Alarcon G, Tracy I, Strand G, Singh K, Macaluso M. Survival and drug discontinuation in a large cohort of methotrexate treated rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 708-712.
47. Myllykangas-Luosujärvi R, Aho K, Isomäki H. Death attributed to antirheumatic medication in a Nationwide series of 1666 patients with rheumatoid arthritis who have died. *J Rheumatol* 1995; 22: 2214-2217.
48. Allebeck P, Ahlbom A, Allander E. Increased mortality among persons with rheumatoid arthritis, but where rheumatoid arthritis does not appear on the death certificate. *Scand J Rheumtol* 1981; 10: 301.

49. Lewis P, Hazleman B, Hanka R, Roberts S. Cause of death in patients with rheumatoid arthritis with particular reference to azathioprine. *Ann Rheum Dis* 1980; 39: 457-461.
50. Laakso M, Mutru O, Isomäki H, Koota K. Cancer mortality in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1986; 13: 522-526.
51. Monson R, Hall A. Mortality among arthritics. *J Chronic Dis* 1976; 29: 459.
52. Hakulinen T, Isomaki H, Knekt P. Rheumatoid arthritis and cancer studies based on linking Nationwide registries in Finland. *Am J Med* 1985; 78 (IA): 29-32.
53. Isomäki H, Hakulinen T, Joutsenlahti U. Excess risk of lymphomas, leukaemias and myeloma in patients with rheumatoid arthritis. *J Chronic Dis* 1978; 31: 691-696.
54. Banks MJ, Flint EJ, Bacon PA, Kitas GD. Expression and prevalence of ischaemic heart disease in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41 Suppl 9: S209.
55. Corrao S, Salli L, Arnone S, Scaglione R, Amato V, **Cecala M et al.** Cardiac involvement in rheumatoid arthritis: evidence of silent heart disease. *Eur Heart J* 1995; 16: 253- 256.
56. Wislowska M, Sypula S, Kowalik I. Echocardiographic findings, 24 hour electrocardiographic holter monitoring in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1998; 17: 369- 377.
57. Solomon DH, Karlson EW, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JE, Stampfer MJ, Curhan GC. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2003; 107:1303-1307.
58. Van Albada-Kuipers G, Brujn J, Westedt M, Breedveld F, Eulderink F. Coronary arteritis complicating rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1986; 45: 963-965.
59. Karten I. Arteritis, myocardial infarction and rheumatoid arthritis. *JAMA* 1969; 210: 1717-1720.
60. Swezey R. Myocardial infarction due to rheumatoid arthritis. *JAMA* 1967;199: 855-857.
61. Voyles W, Searles R, Bankhurst A. Myocardial infarction caused by rheumatoid vasculitis. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 860-863.

62. Morris P, Imber M, Heinsimer J, Hlatky M, Reimer K. Rheumatoid arthritis and coronary arteritis. *Am J Cardiol* 1986; 57: 689-690.
63. Rössner S, Löfmark C. Dyslipoproteinaemia in patients with active, chronic polyarthritis. A study on serum lipoproteins and triglyceride clearance. *Atherosclerosis* 1977; 28: 41-52.
64. Svenson K, Lithell H, Hällgren R, Selinus I, Vessby B. Serum lipoprotein in active rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory arthritis. *Arch Intern Med* 1987; 147: 1912-1916.
65. Svenson K, Lithell H, Hällgren R, Vessby B. Serum lipoprotein in active rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory arthritis. *Arch Intern Med* 1987; 147: 1917-1920.
66. Lazarevic M, Vitic J, Mladenovic V, Myones B, Skosey J, Swedler W. Dyslipoproteinaemia in the course of active rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1992; 22: 172-180.
67. Park YB, Lee SK, Lee WK, Suh CH, Lee CW, Song CH, Lee J. Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26: 1701- 1704.
68. Tselepis A, Elisaf M, Basis S, Karabina SA, Chapman MJ, Siamopoulou A. Association of the inflammatory state in active juvenile rheumatoid arthritis with hypo high density lipoproteinemia and reduced lipoprotein associated platelet activating factor acetylhydrolase activity. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 373- 383.
69. Dahlén G. Lp(a) lipoprotein in cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 1994; 108: 111-126.
70. Rantapää-Dahlqvist S, Wallerberg-Jonsson S, Dahlén G. Lipoprotein (a), lipids, and lipoproteins in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991; 50: 366-368.
71. Asanuma Y, Kawai S, Aoshima H, Kaburaki J, Mizushima Y. Serum lipoprotein (a) and apolipoprotein (a) phenotypes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 443- 447.
72. Wordsworth P. The immunogenetics of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 1990; 2: 423-429.

73. Ramharack R, Barkalow D, Spahr A. Dominant negative effect of TGF- β 1 and TNF- α on basal and IL-6 induced lipoprotein (a) and apolipoprotein (a) mRNA expression in primary monkey hepatocyte cultures. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 984-990.
74. Lunec J, Halloran SP, White AG, Dormandy TL. Free radical oxidation products in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1981; 8: 233-245.
75. Selly ML, Bourne DJ, Bartlett MR, Tymms KE, Brook AS, Ardlie NG. Occurrence of 4-hydroxy-2-nonenal in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 481-484.
76. Sklodowska M, Gromadzinska J, Biernacka M, Wasowicz W, Wolkanin P, Marszalek A, Brozik H, Pokuzynska K. Vitamin E, thiobarbituric acid reactive substance concentrations and superoxide dismutase activity in the blood of children with juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14: 433-439.
77. Heliövaara M, Knekt P, Aho K, Aaran RK, Alfthan G, Aromaa A. Serum antioxidants and risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 51-53.
78. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *L Biol Chem* 1997; 272: 20963-20966.
79. Esterbauer H, Ramos P. Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1995; 127:31-64.
80. Steinbrecher UP, Lougheed M, Kwan WC, Dirks M. Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein by products of fatty acid peroxidation. *J Biol Chem* 1989; 264: 15.216-15.223.
81. Girona J, La Ville AE, Heras M, Olivé S, Masana L. Oxidized lipoproteins including HDL and their lipid peroxidation products inhibit TNF- α secretion by THP-1 human macrophages. *Free Rad Biol Med* 1997; 23: 658-667.
82. Pryor WA. Vitamin E and Heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Rad Bio Med* 2000; 28: 141-164.
83. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-1155.

84. Nygard O, Nordrehaug J, Refsum H, Ueland M, Farstad M, Vollset S. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *New Engl J Med* 1997; 337: 230-236.
- 85.-Roubenoff R, Dellaripa P, Nadeau MR, Abad LW, Muldoon BA, Selhub J, Rosenberg IH. Abnormal homocysteine metabolism in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 718-722.
86. Silman AJ, Newman J, MacGregor AJ. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 732- 735.
87. Saag KG, Cerhan JR, Kolluri S, Ohashi K, Hunninghake GW, Schwartz DA. Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 463-469.
88. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
89. Jacobsson LT, Turesson C, Hanson RL, Pillemer S, Sievers ML, Pettitt DJ, Bennett PH, Knowler WC. Joint swelling as a predictor of death from cardiovascular disease in a population study of Pima Indians. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1170-1176.
90. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis an up-date. *N Engl J Med* 1986; 314: 488- 500.
91. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801- 809.
92. Falk E, Shah P, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92: 657-671.
93. Kullo IJ, Edwards WD, Schwartz RS. Vulnerable plaque: pathobiology and clinical implications. *Ann Intern Med* 1998; 129: 1050- 1060.
94. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996; 98: 2572- 2579.
95. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, Fallon JT, Regnstrom J, Fuster V. Human monocyte derived macrophage induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of

matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 1995; 12: 1565- 1569.

96. Wight TN. The vascular extracellular matrix. *Atherosclerosis and Coronary Artery disease*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996; Chapter 24: 421- 439.

97. Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions and role in physiological processes. *Physiol Rev* 1991; 71: 481- 539.

98. Stary HC, Blankenhorn D, Chandler A, Glasgow S, Insull W, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CS, Wagner WD. A definition of the intima of human arteries and its atherosclerosis-prone regions. *Circulation* 1992; 85: 391- 405.

99. Camejo G, Olofsson S, López F, Carlsson P, Bondjers G. Identification of apoB-100 segments mediating the interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 368- 377.

100. Camejo G, Hurt-Camejo E, Olsson U, Bondjers G. Proteoglycans and lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1993; 4: 385- 391.

101. Olsson U, Camejo G, Hurt- Camejo E, Elfsber K, Wiklund O, Bondjers G. Possible functional interactions of apoprotein B-100 segments that associate with cell proteoglycans and the apoB/E receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 149- 155.

102. Vijayagopal P, Srinivasan SR, Radhakrishnamurty B, Berenson GS. Lipoprotein-proteoglycan complexes from atherosclerotic lesions promote cholesteryl ester accumulation in human monocytes/macrophages. *Arteriocler Thromb* 1992; 12: 237- 249.

103. Camejo G, Hurt- Camejo E, Rosengren B , Wiklund O, López F, Bondjers G. Modification of copper-catalyzed oxidation of low density lipoprotein by proteoglycans and glycosaminoglycans. *J Lipid Res* 1991; 32: 1983- 1991.

104. Hurt- Camejo E, Camejo G, Rosengren B , López F, Fager G, Bondjers G. Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arteriocler Thromb* 1992; 12: 569- 583.

105. McNamara J, Small D, Li Z, Schaefer E. Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformational changes in apoprotein B. *J Lipid Res* 1996; 37: 1924- 1935.
106. McNamara J, Campos H, Ordovás J, Peterson J, Wilson P, Schaefer E. Effect of gender, age, and lipid status on low density subfraction distribution. *Arteriosclerosis* 1987; 7: 483- 490.
107. Vega G, Grundy S. Hypoalphalipoproteinemia (low density lipoprotein) as a risk factor for coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 209- 216.
108. Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, López F, Wiklund O, Bondjers G. Differential uptake of proteoglycan-selected subfractions of low density lipoprotein by human macrophages. *Lipid Res* 1990; 31: 1387- 1398.
109. Camejo G, Acquatella H, Lalaguna F. The interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans: an additional risk factor?. *Atherosclerosis* 1980; 36: 55-65.
110. Hurt-Camejo E, Olsson U, Wiklund O, Bondjers G, Camejo G. Cellular consequences of the association of apoB lipoproteins with proteoglycans: potential contribution to atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1011- 1017.
111. Tribble DL, Holl LG, Wood PD, Krauss RM. Variations in oxidation susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of different density and particle size. *Atherosclerosis* 1992; 93: 189- 199.
112. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl J, Jügens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341-390.
113. Camejo G, Halberg C, Manschik-Lundin, Hurt-Camejo E, Rosengren B, Olsson H, Hansson GI, Forsberg GB, Ylhen B. Hemin binding and oxidation of lipoproteins in serum: mechanisms and effect on the interaction of LDL with human macrophages. *J Lipid Res* 1998; 39: 755-765.
114. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: Implications for the oxidized low density hypothesis. *Atherosclerosis* 1998; 141: 1-15.
115. Masana L, Shaikh M, La ville A, Lewis B. Lipid peroxidation of low density lipoprotein by human endothelial cells modifies its metabolism in vitro. *Rev Esp Fisiol* 1986; 42: 99-104.

116. Fuhrman B, Oiknine J, Aviram M. Iron induces lipid peroxidation in cultured macrophages, increases their ability to oxidatively modify LDL, and effects their secretory properties. *Atherosclerosis* 1994; 111: 65-78.
117. Harland WA , Gilbert JD, Brooks CJW. Lipids of human atheroma. Oxidised derivatives of cholesteryl linoleate. *Biochim Biophys Acta* 1973; 316: 378-384.
118. Mallat Z, Nakamura T, Ohan J, Laseche G, Tedgui A, Maclouf J, Murphy C. The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes it instability in human carotid atherosclerosis. *J Clin Invest* 1999; 103: 421-427.
119. Ku G, Thomas CE, Akesson AL, Jackson RL. Induction of interleukin-1 β expression from human peripheral blood monocyte derived macrophages by 9-hydroxyoctadecadienoic acid. *J Biol Chem* 1992; 267: 14183-14188.
120. Ramasamy S, Like DW, Boissonneault GA, Guo H, Hennig B. Oxidized lipid-mediated alterations in proteoglycan metabolism in cultured pulmonary endothelia cells. *Atherosclerosis* 1996; 120: 199-208.
121. Pacifici EHK, McLeod LL, Peterson H, Sevanian A. Linoleic acid hydroperoxide-induced peroxidation of endothelial cell phospholipids and cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 285-295.
122. Esterbauer H, Zollner H, Schaur R, Aldehydes formed by lipid peroxidation: mechanism of formation, occurrence and determination. In: Pelfrey C. *Membrane Lipid Oxidation (Vol I)*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1990. Chapter 11: 139-268.
123. McCall MR, Tang JY, Bielicki JK, Foerte TM. Inhibition of lecithin-cholesterol acyltransferase and modification of HDL apolipoproteins by aldehydes. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1599-1606.
124. Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr* 1993; 57 (suppl): 779S-786S.
125. Sevanain A, Bittolo-Bon G, Cazzolato G, Hodis H, Hwang J, Zamburlini A, Maiorino M, Ursini F. LDL-is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *J Lipid Res* 1997; 38: 419-428.
126. Chang YH, Aballa DSP, Sevanian A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 202-214.

127. Rong JX, Rangaswamy S, Shen L, Dave R, Chang YH, Peterson H, Hodis HN, Chilsom GM, Sevanian A. Arterial injury by cholesterol oxidation products causes endothelial dysfunction and arterial wall cholesterol accumulation. *Arterioscler Thromb Biol* 1998; 18: 1885-1894.
128. Lizard G, Lemaire S, Monier S, Gueldry S, Neel D, Gambert P. Induction of apoptosis and IL-1 β secretion by 7 β -hydrocholesterol and 7-ketocholesterol: partial inhibition by Bcl-2 overexpression. *FEBS Lett* 1997; 419: 276-280.
129. Lemaire S, Lizard G, Monier S, Miguet C, Guelfry S, Gambert P, Neel D. Different patterns of IL-1 β secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7 α -7 β -hydrocholesterol, or 7-ketocholesterol. *FEBS Lett* 1998; 440:434-439.
130. Ryborg AK, Deleuran B, Thestrup Pedesen K, Kragballe K. Lysophosphatidylcholine: a chemoattractant to human T lymphocytes. *Arch Dermatol Res* 1994; 286: 462-465.
131. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 1138-1144.
132. Stiko A, Regnstrom J, Shah K, Cercek B, Nilsson J. Active oxygen species and lysophosphatidylcholine are involved in oxidized low density lipoprotein activation of smooth muscle cell DNA synthesis. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1996; 16: 194-200.
133. Liu-Wu Y, Hurt-Camejo E, Wiklund O. Lysophosphatidylcholine induces the production of IL-1 β by human monocytes. *Atherosclerosis* 1998; 137: 351-357.
134. Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidation stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1997; 17: 2309-2315.
135. Practico D, Iuliano L, Spagnoli L, Mauriello A, Lawson JA, RokachJ, Maclouf J, Violi F, FitzGerald GA. Localization of distinct E2 isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; 100: 2028-2034.
136. Halliwell B. Reactive oxides species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*1991; 91(suppl 3C): 14S-22S.
137. Ballester M. Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. *Med Clin* 1996; 107: 509-515.

138. Tappel AL. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitam Horm* 1962; 20: 493-510.
139. Bowry WW, Stocker R. Tocopherol-mediated peroxidation. The pro-oxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. *J Am Chem Soc* 1993; 115: 6029-6040.
140. Dennis EA. Diversity of groups types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* 1994; 269: 13057- 13060.
141. Kovanen PT, Pentikäinen MO. Secretory group II phospholipase A2. A newly recognized acute phase reactant with a role in atherogenesis. *Cir Res* 2000; 86: 610-612.
142. Angel J, Colard O, Chevy F, Fournier C. Interleukin-1-mediated phospholipid breakdown and arachidonic acid release in human synovial cells *Arthritis Rheum* 1993; 36: 158-167.
143. Pruzanski J, Urowitz MB, Grouix B, Vadas P. Induction of TNF- α and proinflammatory secretory phospholipase A2 by administration of CAMPATH-1H in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995; 22: 1816-1819.
144. Bomalaski JS, Clark MA. Phospholipase A2 and arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 190-198.
145. Jamal OS, Conaghan PG, Cunningham AM, Brooks PM, Munro VF, Scott KF. Increased expression of human type IIa secretory phospholipase A2 antigen in arthritic synovium. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 550-558.
146. Michaels RM, Reading JC, Beezhold DH, Ward JR. Serum phospholipase A2 activity in patients with rheumatoid arthritis before and after treatment with methotrexate, auranofin, or combination of two. *J Rheumatol* 1996; 23: 226-229.
147. Koo See Lin M, Farewell V, Vadas P, Bookman A, Keystone EC, Pruzanski W. Secretory Phospholipase A2 as index of disease activity in rheumatoid arthritis. Prospective double blind study of 212 patients. *J Rheumatol* 1996; 23: 1162-1166.
148. Tailleux A, Torpier G, Caron B, Fruchart JC, Fievet C. Immunological properties of apoB containing lipoprotein particles in human atherosclerotic arteries. *J Lipid Res* 1993; 34: 719- 728.

149. Hurt-Camejo E, Andersen S, Sandal R, Rosengren B, Sartipy P, Stadberg E, Johansen B. Localization of non pancreatic secretory phospholipase A₂ in normal and atherosclerotic arteries: activity of the isolated enzyme on low density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 300-309.
150. Hurt-Camejo E, Camejo G. Potential involvement of type II phospholipase A₂ in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1997; 132: 1- 8.
151. Sartipy P, Bonjers G, Hurt-Camejo. Phospholipase A₂ Type II binds to intracellular matrix biglycan: modulation of its activity on LDL by localization in glycosaminoglycan matrixes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1934-1941.
152. Sartipy P, Johansen B, Gasvik, Hurt-Camejo E. Molecular basis for the association of group IIA phospholipase A₂ and decorin in human atherosclerotic lesions. *Circ Res* 2000; 86: 707-714..
153. Mangin EL, Kugiyama K, Nguy JH, Kerns SA, Henry PD. Effects of lysolipids and oxidatively modified low density lipoprotein on endothelium dependent relaxation of rabbit aorta. *Circulation* 1992; 72: 161- 166.
154. Kume N, Gimbrone MA. Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 907- 911.
155. Garay SF. Rheumatoid synovitis and pannus. In: Klippel JH, Dieppe PA *Rheumatology*. Mosby-Doyma, London 1995. Section 3; Chapter 12: 1-30.
156. Pascari V, Yeh ETH. A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation* 1999; 100: 2124-2126.
157. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340: 448-454.
158. Brozik M, Rosztoczy K. Interleukin 6 levels in synovial fluids of patients with different arthritides: correlation with local Ig M rheumatoid factor and systemic acute phase protein production. *J Rheumatol* 1992; 19: 63-68.
159. Otterness IV. The value of C-reactive protein measurement in rheumatoid arthritis. *Sem Arthritis Rheum* 1994; 24: 91-104.

160. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore R, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331: 417-424.
161. Ridker PM; Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336: 973-979.
162. 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* 2000; 342: 836-843.
163. Ridker PM, Bassuk SS, Toth PP. C-reactive protein and risk of cardiovascular diseases: evidencia and clinical application. *Curr Atheroscler Rep* 2003; 5: 341-349.
164. Pepys MB, Hirschfeld GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003; 111: 1805-1812.
165. Fox D. Cytokine blockade as a new strategy to treat rheumatoid arthritis. Inhibition of tumor necrosis factor. *Arch Intern Med* 2000; 160: 437-444.
166. Van Den Berg WB, Joosten LA, Kollias G, Van De Loo FA. Role of tumor necrosis factor alpha in experimental arthritis separate activity of interleukin 1 beta in chronicity and cartilage destruction. *Ann Rheum Dis* 1999; 58 (suppl I): 140-148.
167. Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, Schiff MH, Keystone EC, Genovese MC, Wasko MC, Moreland LW, Weaver AL, Markenson J, Finck B. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1586-1593.
168. Lipsky PE, Van der Heijde DM, .Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Weisman M, Emery P, Feldman M, Harriman GR, Maini RN. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1594-1602.
169. Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridisation. *Am J Pathol* 1990; 137: 503-509.

170. Tipping PG, Hancock WW. Production of tumor necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atheromatous plaques. *Am J Pathol* 1993; 142: 1721-1728.
171. Vaddi K, Nicolini FA, Metha P, Metha JL. Increased secretion of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by mononuclear leukocytes in patients with ischemic heart disease. Relevance in superoxide anion generation. *Circulation* 1994; 90: 694-699.
172. Cid MC, Esparza J, Juan M. Moléculas de adhesión en las interacciones entre los leucocitos, el endotelio y la matriz extracelular (I). Estructura, distribución y función biológica. *Med Clin* 1997; 108: 472-477.
173. Cid MC, Coll-Vinent B, Grau JM. Moléculas de adhesión en las interacciones entre los leucocitos, el endotelio y la matriz extracelular (II). Relevancia en clínica humana y aplicaciones terapéuticas potenciales. *Med Clin* 1997; 108: 503-511.
174. Varani J, Mulligan MS, Ward PA. The vascular endothelium and acute inflammation. In: Klippel JH, Dieppe PA. *Rheumatology*. Mosby-Doyma, London 1995. Section 3; Chapter 11: 1-12.
175. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 1996; 93: 672-682.
176. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy. *Lancet* 1998; 351: 88-92.
177. Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T. Reduced expression of the regulatory CD4⁺ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 617-627.
178. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, Mcshane DJ, Fries JF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-324.
179. Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Chernoff M, Fried B et al. The American college of Rheumatology preliminary core set of disease activity measures for rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 729-740.

180. Redelmeier DA, Lorig K. Assessing the clinical importance of symptomatic improvements. *Arch Intern Med* 1993; 153: 1337-1342.
181. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 1345-1350.
182. González-Juanatey C, Llorca J, Testa A, Revuelta J, Garcia-Porrúa C, González-Gay A. Increased prevalence of severe subclinical atherosclerotic findings in long-term treated rheumatoid arthritis patients without clinically evident atherosclerotic disease. *Medicine* 2003; 82: 407-413