

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:

Cardiologia e Ciências Cardiovasculares

**Efeitos da Suplementação de Ácido Folínico sobre a Função Endotelial
de Indivíduos Infectados pelo HIV em uso de Terapia Antirretroviral**

Shana Souza Grigoletti

Orientador: Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Ruy Silveira Moraes Filho

Colaborador: Prof. Dr. Eduardo Sprinz

Porto Alegre

2011

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:

Cardiologia e Ciências Cardiovasculares

**Efeitos da Suplementação de Ácido Folínico sobre a Função Endotelial
de Indivíduos Infectados pelo HIV em uso de Terapia Antirretroviral**

Shana Souza Grigoletti

**Dissertação de mestrado apresentada como Requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências
Cardiovasculares, à Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências
Cardiovasculares**

Orientador: Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Ruy Silveira Moraes Filho

Colaborador: Prof. Dr. Eduardo Sprinz

Porto Alegre

2011

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho não teria sido possível sem apoio de todos aos quais expressei minha gratidão.

Agradeço com admiração aos meus orientadores e co-orientadores Prof. Jorge, Prof. Ruy e Prof. Eduardo, pelas oportunidades e ensinamentos.

Aos colegas do Lafix pela convivência e troca de experiências.

Especial agradecimento a colega Grace Guindani pela ajuda na realização do meu projeto. Não foi apenas uma colega, sua amizade foi uma das minhas grandes conquistas nesta etapa.

Aos pacientes que aceitaram participar deste trabalho e entenderem a importância da pesquisa científica.

À minha amiga e colega de profissão Francisca que esteve presente desde o princípio, pelo apoio e incentivo.

Agradeço à aos meus pais pelo amor e carinho, por sempre me apoiarem e acreditarem nos meus sonhos.

Ao meu irmão, pelo carinho, companheirismo e incentivo.

Aos meus amigos pela amizade e por compreenderem minha ausência em muitos momentos.

Ao meu namorado Cristian, pelo amor, carinho, apoio e compreensão. Não importando a distância esteve sempre presente.

A todos que participaram e me ajudaram de alguma forma em algum momento desta caminhada. Obrigada!

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar”

Anatole France

(1844-1924)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
CAPÍTULO I	13
1 INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO II.....	15
REVISÃO DA LITERTURA	15
1 EPIDEMIOLOGIA DO HIV	15
2 CARACTERÍSTICAS DA INFECÇÃO.....	16
3 CICLO VIRAL DO HIV	20
4 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL	22
5 DOENÇAS CARDIOVASCULARES E HIV.....	25
5.1 <i>Fatores de risco tradicionais para DCV.....</i>	<i>26</i>
5.2 <i>Infecção pelo HIV.....</i>	<i>26</i>
5.3 <i>Influência da Terapia antirretroviral.....</i>	<i>27</i>
5.4 <i>Outros possíveis fatores relacionados à doença cardiovascular.....</i>	<i>28</i>
6 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E HIV.....	28
7 ÁCIDO FÓLICO E FUNÇÃO ENDOTELIAL.....	30
7.1 <i>Mecanismos de ação do ácido fólico/derivados do folato</i>	<i>31</i>
7.1.1 <i>Ação sobre homocisteína.....</i>	<i>32</i>

7.1.2 Redução na produção de superóxidos	32
7.1.3 Ação sobre eNOS	33
7.1.4 Ação antitrombótica	34
7.1.5 Outros possíveis mecanismos de ação.....	35
8 JUSTIFICATIVA.....	36
9 REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO III	54
OBJETIVOS.....	54
CAPÍTULO IV.....	55
ARTIGO ORIGINAL	55
INTRODUCTION.....	55
SUBJECTS AND METHODS	56
RESULTS.....	59
DISCUSSION.....	65
REFERENCE	68

LISTA DE ABREVIATURAS

REVISÃO DA LITERATURA

5-MTHF	5-metiltetrahidrofolato
AF	Ácido Fólico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Antirretrovirais
BH₂	Dihidrobiopterina
BH₄	Tetrahidrobiopterina
CD4	Linfócitos T CD4+
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
CV	Carga viral
DCV	Doenças cardiovasculares
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
gp120	Glicoproteína 120
gp41	Glicoproteína 41
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
IL-6	Interleucina 6
IP	Inibidores da Protease
ITRN	Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos
ITRNN	Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeos
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
nef	fator negativo

NO	Óxido nítrico
PCR	Proteína C reativa
RNA	Ácido ribonucléico
sICAM-1	Moléculas de adesão intracelular solúvel
TARV	Terapia antirretroviral
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
VCAM-1	Moléculas de adesão de célula vascular
Vif	Fator de infectividade viral
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
Vpr	Proteína viral R
Vpu	Proteína viral U
vWF	Fator Von Willebrand

ARTIGO ORIGINAL

ART	Antiretroviral therapy
HIV	Human immunodeficiency virus
CVD	Cardiovascular disease
BP	Blood Pressure
RH	Reactive hyperemia
HDL-C	High density lipoprotein cholesterol

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Curso clínico da infecção do HIV

Figura 2. Ação da TARV

Figura 3A. Potenciais Mecanismos de ação do ácido fólico/derivados do folato

Figura 3B. Potenciais Mecanismos de ação do ácido fólico/derivados do folato

ARTIGO ORIGINAL

Figure 1. Participants Flow Diagram

Figure 2A. Effect of folic acid or placebo on reactive hyperemia after 4 week intervention

Figure 2B. Effect of folic acid or placebo on endothelium-independent vasodilation after 4 week intervention

Figure 3. Correlation between the change in serum folic acid and the change in reactive hyperemia response

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Classificação da TARV e mecanismo de ação

ARTIGO ORIGINAL

Table 1. Subject's characteristics

Table 2. Hemodynamic and biochemical parameters at baseline and after 4 week intervention

RESUMO

Título: A suplementação de ácido folínico melhora a função endotelial de indivíduos infectados pelo HIV em uso contínuo de terapia antirretroviral: um ensaio clínico randomizado

Introdução: Indivíduos infectados pelo HIV apresentam um conjunto de condições que levam a disfunção endotelial. Vários estudos demonstram que a administração de folatos possui efeitos benéficos sobre a função endotelial de diferentes populações com risco cardiovascular.

Objetivo: Determinar o efeito da suplementação de ácido folínico por 4 semanas sobre as respostas vasculares da artéria braquial durante a hiperemia reativa ou após a administração de nitroglicerina em indivíduos infectados pelo HIV em uso contínuo de terapia antirretroviral.

Delineamento: É um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo

Local: O estudo foi realizado nos ambulatórios do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, um centro de referência nacional em HIV/AIDS no sul do Brasil

População: Foram avaliados 30 indivíduos infectados pelo HIV. Os participantes estavam em uso contínuo de terapia antirretroviral por pelo menos 6 meses, com carga viral indetectável e contagem de CD4 > 200 células/mm³. Os critérios de exclusão foram diabetes mellitus, infecção, doença hepática, doença renal, história de doença cardiovascular ou hipertensão não controlada.

Intervenção: Os participantes foram randomizados para receber suplementação de ácido folínico 5mg/dia (n=15) ou placebo (n=15) por 4 semanas

Desfechos: Respostas vasculares da artéria braquial foram avaliadas por pletismografia no início do estudo e após 4 semanas, durante a hiperemia reativa e após a administração de dose única de dinitrato de isossorbida sublingual, um vasodilatador endotélio-independente. Concentrações séricas de ácido fólico e de homocisteína plasmática foram medidas em ambos os momentos.

Resultados: A suplementação de ácido folínico resultou em aumento do ácido fólico sérico, redução nos níveis de homocisteína e melhora significativa da hiperemia reativa. A vasodilatação endotélio independente não sofreu alterações em ambos os grupos. Nenhum efeito adverso foi observado.

Conclusão: Esse estudo demonstrou que a suplementação de ácido folínico durante 4 semanas pode melhorar a resposta vascular, aumentando a hiperemia reativa de indivíduos infectados pelo HIV em terapia antirretroviral.

ABSTRACT

Title: Short term folic acid supplementation improves endothelial function in HIV-infected people: a randomized trial

Background: HIV infected people present a clustering of conditions that activate or injure the endothelium. Various studies suggested that the administration of folates exert beneficial effects on endothelial function in different risk population.

Objective: The aim of the study is to determine the 4 week-effect of folic acid on vascular responses of the brachial artery during reactive hyperemia, and after nitrate administration in HIV-infected people under antiretroviral therapy

Design: Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial

Setting: Outpatient clinic of a national reference center for acquired immunodeficiency syndrome, in southern Brazil.

Participants: A total of 30 HIV positive people were evaluated. Participants were currently following a combination antiretroviral therapy regimen for at least 6 months before enrollment, with undetectable viral load (<50 copies/ml), and CD4 cell count > 200 cells/mm³. Exclusion criteria were diabetes mellitus, acute or chronic infection, liver disease, renal disease, history of cardiovascular disease, or uncontrolled hypertension.

Intervention: The participants were randomly assigned to a 4 week treatment with either 5mg/day folic acid (n=15) or to placebo (n=15).

Main outcome measures: Venous occlusion plethysmography was performed at baseline and after 4 weeks, for the determination of brachial artery reactive hyperemia, and after isosorbide dinitrate administration. Serum folic acid and plasma homocysteine were measured at baseline and after 4 week intervention.

Results: Compared with placebo, folic acid supplementation resulted in higher serum folate levels, lower total plasma homocysteine levels, and significant improvement in reactive hyperemia. Endothelium-independent responses were unchanged. No adverse events were observed.

Conclusions: Short-term folic acid supplementation improves endothelial function in HIV-infected people.

CAPÍTULO I

1 Introdução

A terapia antirretroviral (TARV) alterou mundialmente o curso e o prognóstico da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), com uma redução importante na mortalidade e uma melhora na qualidade de vida dessa população (1-2). Neste cenário, a doença cardiovascular (DCV) também ganhou importância como causa de morbidade e mortalidade (3-4).

As manifestações cardiovasculares relacionadas com HIV são consequentes à própria infecção, à autoimunidade, à reação imunológica diante de outras infecções virais, à inflamação crônica, à imunossupressão e à desnutrição (5-7). Com a TARV têm-se observado reduções nas doenças cardíacas causadas por agentes oportunistas, por desnutrição e pela imunossupressão (8). É crescente, contudo, o número de casos de síndromes coronarianas e eventos vasculares periféricos, que ser relacionados tanto ao aumento da sobrevivência da população quanto à toxicidade dos medicamentos(9).

O mecanismo envolvido no aumento do risco de DCV nessa população é complexo e ainda não foi totalmente compreendido. A disfunção endotelial pode contribuir para o aumento de eventos cardiovasculares em indivíduos infectados pelo vírus HIV (10). Vários estudos têm demonstrado uma função endotelial prejudicada em indivíduos infectados pelo HIV, com e sem uso de TARV, quando comparados com a população geral (11-18).

A disfunção endotelial é um marcador precoce de DCV, o que torna o endotélio um importante alvo para a terapia preventiva. Diversas estratégias farmacológicas e não farmacológicas vem sendo testadas para melhorar a função vascular. Evidências

sugerem um importante papel de fatores dietéticos na modulação da função endotelial em pacientes com risco de DCV e naqueles com DCV existente (19). Nesse contexto, têm sido estudada a associação entre a suplementação de ácido fólico (AF) e função endotelial de indivíduos com diferentes riscos de DCV (20-25).

Title e col. demonstram que a suplementação de AF (10mg/dia) em 19 pacientes com diabetes mellitus (DM) pode melhorar a função endotelial desses indivíduos (21). Moens e col. também observam uma melhora semelhante em 40 pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio, com suplementação por 6 semanas (26). Moat et al concluíram que pacientes com doença arterial coronariana, recebendo suplementação de 5mg de AF, também são beneficiados, com melhora significativa da função endotelial (27). Estudos realizados com fumantes (22), com hiperhomocisteinemia (23-24), com hipercolesterolemia familiar (25, 28) e com doença arterial coronariana (29-30) também comprovam os benefícios da suplementação oral com AF sobre a função endotelial. No entanto, essa informação é inexistente em indivíduos infectados pelo HIV.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de AF sobre a função endotelial de indivíduos infectados pelo HIV em uso de TARV.

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERTURA

1 Epidemiologia do HIV

O HIV tipo 1 é uma pandemia mundial, presente em mais de 190 países. Essa doença já adquiriu uma dimensão cujos reflexos começam a atingir o desenvolvimento econômico e social de algumas nações. Segundo os últimos dados do relatório da UNAIDS/WHO, no ano de 2009 havia 33,3 milhões (31,4 – 35,3 milhões) de pessoas vivendo com HIV no mundo e o número estimado de novos casos de infecções foi de 2,6 milhões (2,3 – 2,8 milhões) (31). Apesar do crescente número de novas infecções, o número anual de mortes relacionadas à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, do Inglês *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) em todo o mundo está diminuindo gradativamente, do pico de 2,1 milhões no ano de 2004 para uma estimativa de 1,8 milhões (1,6 – 2,1 milhões) em 2009 (31).

No Brasil o número total de casos notificados de AIDS no período de 1980 – 2010 é de 592.914, com prevalência de 0,6% entre a população de 15 a 49 anos (32-33). No ano de 2009 foram notificados 38.538 casos, sendo 23.467 do sexo masculino e 15.069 do sexo feminino, numa razão (m:f) de 1,6 (32). A distribuição dos casos, segundo as regiões, mostra que 58% encontram-se na Região Sudeste, seguida do Sul (19,5%), Nordeste (12,5%), Centro-Oeste (5,7%) e Norte (4,2%). Embora a Região Sudeste apresente maior número de casos, o Sul destaca-se com a maior taxa de incidência a partir de 2007 (19,4/100.000 habitantes no ano de 2009) (33). Segundo os dados do DATASUS do ano de 2009, dos 8.984 novos casos da região Sul, 5.189 concentram-se no Estado do Rio Grande do Sul, sendo 2.471 na cidade de Porto Alegre (32).

Em número absoluto, o Brasil registrou 229.222 de óbitos no período de 1980 a 2009, tendo como causa básica a AIDS. O coeficiente de mortalidade por AIDS, padronizado em 2009, foi de 6,2 óbitos por 100.000 habitantes. De acordo com o sexo, constata-se que, no mesmo ano, o coeficiente de mortalidade no sexo masculino foi duas vezes maior do que no sexo feminino, com valores de 8,2 e 4,2 por 100.000 habitantes, respectivamente (33).

2 Características da infecção

A AIDS é o estágio final da infecção pelo HIV e tem como principal característica uma disfunção grave e progressiva do sistema imunológico, que predispõe ao desenvolvimento de doenças oportunistas, doenças neurológicas, lesões gastrointestinais, problemas cardiovasculares e cânceres, as quais, se não tratadas levam inevitavelmente ao óbito (34-36). Os primeiros casos foram descritos nos Estados Unidos em 1981 em homens homossexuais, porém só em 1983 o HIV foi isolado e associado a AIDS como agente causal (37).

O HIV é um retrovírus classificado na subfamília dos Lentiviridae. O vírus consiste de um nucleocapsídeo no qual estão inseridas duas cópias de ácido ribonucléico (RNA) com fitas simples e enzimas necessárias para a sua replicação (transcriptase reversa, protease e integrase). O genoma do HIV-1 possui nove genes. Três desses genes estão envolvidos na síntese de proteínas estruturais. São eles: gag, que codifica as proteínas da matriz, do capsídeo e do nucleocapsídeo; pol, que codifica as enzimas protease, transcriptase reversa e integrase; e env, que codifica as duas glicoproteínas do envelope. Os produtos protéicos dos outros seis genes - tat, rev (genes regulatórios), fator de infectividade viral (vif), proteína viral R (vpr), proteína viral U (vpu) e fator negativo (nef) (genes acessórios) - estão envolvidos na regulação da expressão do

genoma do vírus. O nucleocapsídeo está envolvido por um envelope de dupla camada fosfolipídica originária da camada celular do hospedeiro e contendo as proteínas do envelope (a glicoproteína 120 (gp120) e a glicoproteína 41 (gp41) (38-39).

Existem dois tipos de HIV, o HIV-1 e o HIV-2; ambos causam infecção e doença em humanos. O HIV-1 e o HIV-2 têm as mesmas estruturas genéticas, mas podem diferir em até 40% no nível de sequência de ácido desoxirribonucleico (DNA). O HIV-1 é o mais patogênico e o mais prevalente em muitas partes do mundo, enquanto que o HIV-2 é endêmico na África Ocidental e está associado com uma progressão mais lenta da deficiência imune. Três grupos de HIV-1 já foram descritos com base em diferenças no genoma, denominados grupo M (major), O (outlier) e N (não-M e não-O) e talvez um quarto grupo designado grupo P (40-41). A maioria das infecções pelo HIV-1 são causadas pelo grupo M, e estes são divididos em 9 subtipos (A-D, F-H, J e K) (42-43). Dentre os subtipos a média da variabilidade genética é de 15% para o gene gag e 25% para o gene env (44).

Em uma escala global, a forma genética mais prevalente dos subtipos é a A, B e C, estando o subtipo C representando aproximadamente 50% das infecções (44-45). Os subtipos B, F1, D e A circulam no Brasil, porém a maior prevalência é do subtipo B (46). No Rio Grande do Sul, estudos demonstram uma frequência maior dos subtipos B e C (47-48).

O HIV-1 pode ser transmitido pelo sangue (via parenteral e vertical), secreções do trato genital (via sexual), ou pelo leite materno (via vertical). A transmissão do HIV-1, por qualquer via, depende principalmente da concentração do vírus nas células do hospedeiro infectado. As exigências virais e celulares para transmissão do HIV-1, no

entanto, permanecem apenas parcialmente compreendidas (42). O indivíduo infectado pode transmitir o HIV durante todas as fases da infecção, sendo esse risco proporcional à magnitude da viremia, principalmente na infecção aguda e doença avançada.

Os estágios da infecção pelo HIV (**figura 1**) incluem: infecção aguda, a disseminação do vírus ao sistema linfático; fase assintomática, também conhecida como latência clínica; fase sintomática inicial ou precoce, e AIDS. A Infecção (fase) aguda, também chamada de infecção primária, representa o estágio de infecção após a contaminação com o vírus, quando ocorre rápida replicação viral. Após essa fase, o vírus é intensamente disseminado pelo corpo e os órgãos linfóides tornam-se infectados. Entre 25 – 65% das pessoas podem apresentar uma grande quantidade de sinais e sintomas associados à infecção. O tempo entre a exposição e a manifestação dos sintomas é de aproximadamente 3 a 6 semanas. As manifestações clínicas podem variar desde um quadro gripal até uma síndrome que se assemelha à mononucleose, sendo os sintomas graves muito raros (36). Após a soroconversão os anticorpos atingem níveis detectáveis, porém essa resposta imune não é capaz de eliminar a infecção por completo e o vírus irá persistir durante toda a vida.

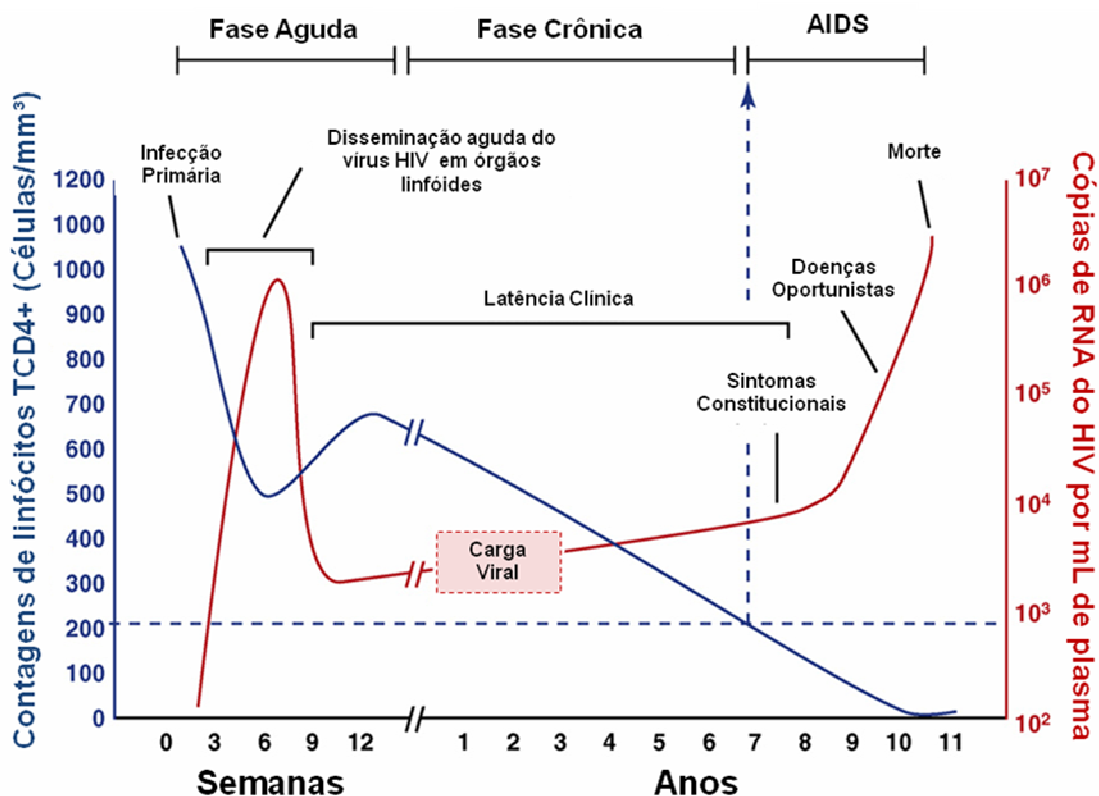


Figura 1 – Curso clínico da infecção do HIV (Adaptado de (49)).

Após a resolução da infecção aguda, a quantidade de vírus no sangue e nos tecidos linfóides diminui. Essa fase, chamada de fase assintomática ou período de latência clínica, é caracterizada pelo comprometimento lento e progressivo do sistema imunológico. Nessa etapa, são poucas ou inexistentes as alterações no estado geral do hospedeiro. As células mais atingidas do sistema imunológico são os linfócitos T CD4+ (CD4) (36). Sem o uso de medicação, esse período pode persistir por 10 anos ou mais. Após o período assintomático, conforme a doença progride, o indivíduo infectado pode apresentar um conjunto de sinais e sintomas inespecíficos e de intensidade variável, tais como: mal-estar, febre, sudorese noturna, diarreia e perda de peso, caracterizando a fase sintomática inicial do HIV (36). Com o tempo, o organismo fica altamente suscetível ao aparecimento de doenças, como infecções oportunistas, doenças cardiovasculares e

renais, doenças neurológicas, depressão da medula óssea e cânceres (35) O critério para o diagnóstico de AIDS deve-se a uma combinação de sintomas ou aos níveis de CD4 menor de 200 células/mm³ ou, no Brasil, menor do que 350 células/mm³. Na ausência de tratamento adequado, a morte é praticamente inevitável, podendo levar aproximadamente um período de dois anos (36).

3 Ciclo viral do HIV

O ciclo reprodutivo do HIV tem início com a entrada do vírus na célula por meio das glicoproteínas presentes no envelope viral (gp41 e gp120), essenciais para o reconhecimento do vírus e entrada nas células-alvo. A gp120 se liga com alta afinidade ao receptor CD4 da célula, porém a interação entre a gp120 e o CD4 não é suficiente para a entrada do HIV na célula. Esta glicoproteína também deve ligar-se a um co-receptor na membrana da célula hospedeira, principalmente o CCR5 e o CXCR4. Essa ligação, da gp120 com o CD4, permite uma fixação mais estável entre o vírus e a célula, em seguida, ao expor o domínio hidrofóbico da gp41, ocorre o processo de absorção e consequente fusão das membranas (envelope viral com a membrana plasmática celular) e subsequente entrada do nucleocapsídeo viral, liberando posteriormente o genoma (RNA) e as proteínas virais (transcriptase reversa e integrase) processo denominado desencapsulamento (38-39, 50)

A conversão do RNA viral a DNA proviral é realizada a partir da ação da transcriptase reversa e da integrase. No citoplasma, a transcriptase reversa transcreve o genoma de RNA viral em DNA pró-viral de fita dupla. A proteína integrase permite que a cadeia de DNA viral se integre ao genoma humano (38). O provírus pode permanecer inativo por meses ou anos, com pouca ou nenhuma produção de novas proteínas virais e

dessa maneira a infecção pelo HIV pode permanecer latente do ponto de vista clínico (39).

A ativação da transcrição é feita por citocinas e elementos reguladores do gene viral através de um mecanismo pouco conhecido. Transcritos completos do RNA viral são produzidos e os genes virais são expressos como proteínas (39, 51). O processo de transcrição resulta inicialmente na síntese dos genes reguladores, tais como as proteínas tat e rev. Rev facilita a transcrição de RNA transcrito e a expressão de genes estruturais (env, gag e pol) e enzimáticos (proteínas acessórias como o vif, vpu, nef e vpr, além de inibir a produção de proteínas reguladoras, assim promovendo a formação de partículas virais maduras (38-39, 51).

Após a transcrição, o RNA mensageiro migra para o citoplasma, onde as novas proteínas virais são sintetizadas, formando a estrutura central do vírus. As proteínas codificadas pelos genes pol e gag formam o núcleo da partícula de HIV madura, os produtos dos genes codificados pelo gene env formam as glicoproteínas do envelope viral. A maioria das moléculas precursoras de gp160 são clivadas pela protease do HIV-1 em gp120 e gp41. As proteínas de gag e pol também são derivadas da molécula precursora 160 kD, da qual a protease do HIV cliva a p24, p17, p9 e p7, produtos finais de gag e da proteína pol. A clivagem da molécula precursora pela protease do HIV-1 é necessária para a formação das partículas virais infecciosas (38). Esse complexo de nucleoproteínas é fechado em um envelope e o vírus é liberado da célula para a corrente sanguínea (39, 51-52).

4 Terapia Antirretroviral

Nos últimos anos os esforços na luta contra o HIV têm alcançado importantes avanços na terapia e prevenção desta patologia. Foram feitos muitos progressos no conhecimento dos parâmetros imunológicos e virológicos da doença, transmissão e resistência à TARV (53). Em 1986, a média de sobrevivência em indivíduos infectados pelo HIV era de no máximo dez anos. Atualmente mais de 85% das pessoas em uso de TARV sobrevivem mais de 10 anos (54). A TARV alterou mundialmente o curso e o prognóstico da doença, com uma redução importante na mortalidade e uma melhora na qualidade de vida dessa população (1). Os antirretrovirais (ARV) são medicamentos supressivos que não curam a infecção pelo HIV (31, 42).

Somente em 2009, 1,2 milhões de pessoas receberam TARV pela primeira vez, representando um aumento de 30% em um único ano e mais de cinco milhões de pessoas em países de baixa e média renda estão recebendo TARV, desde 2004. Em termos globais, essa expansão do acesso ao tratamento tem contribuído para o declínio de 19% de mortes entre as pessoas que vivem com HIV entre 2004 e 2009 (31). O Brasil foi o primeiro país em desenvolvimento a distribuir gratuitamente os antirretrovirais para indivíduos infectados pelo HIV. Desde 1988, o Sistema Único de Saúde (SUS) tem distribuído medicamentos para o tratamento de infecções oportunistas. Em 1991, iniciou-se a distribuição do antirretroviral zidovudina (55).

O objetivo do tratamento é o controle prolongado da replicação viral (alcançar e manter a carga viral (CV) indetectável (<50 cópias/mL)) (56) e, conseqüentemente, proporcionando uma maior sobrevivência ao indivíduo infectado, com prevenção ou reversão das manifestações da infecção pelo HIV (57-58). A decisão de tratar a infecção

com a TARV é feita com base na contagem de CD4 e na CV em indivíduos assintomáticos (59).

Até 2010, mais de 20 agentes ARV foram licenciados. Os medicamentos ARV são classificados de acordo com seu mecanismo de ação e a fase do ciclo de vida viral que atuam (interrompem) (**figura 2**). A subclassificação pode ser baseada em sua estrutura química. Esses agentes são divididos em 5 classes de fármacos em uso clínico: 1) Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (ITRN), 2) Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeos (ITRNN), 3) Inibidores da Protease (IP), 4) Inibidores de Entrada (Inibidores de Fusão e Inibidor do co-receptor CCR5) e 5) Inibidores da Integrase (39, 56, 59) (**tabela 1**).

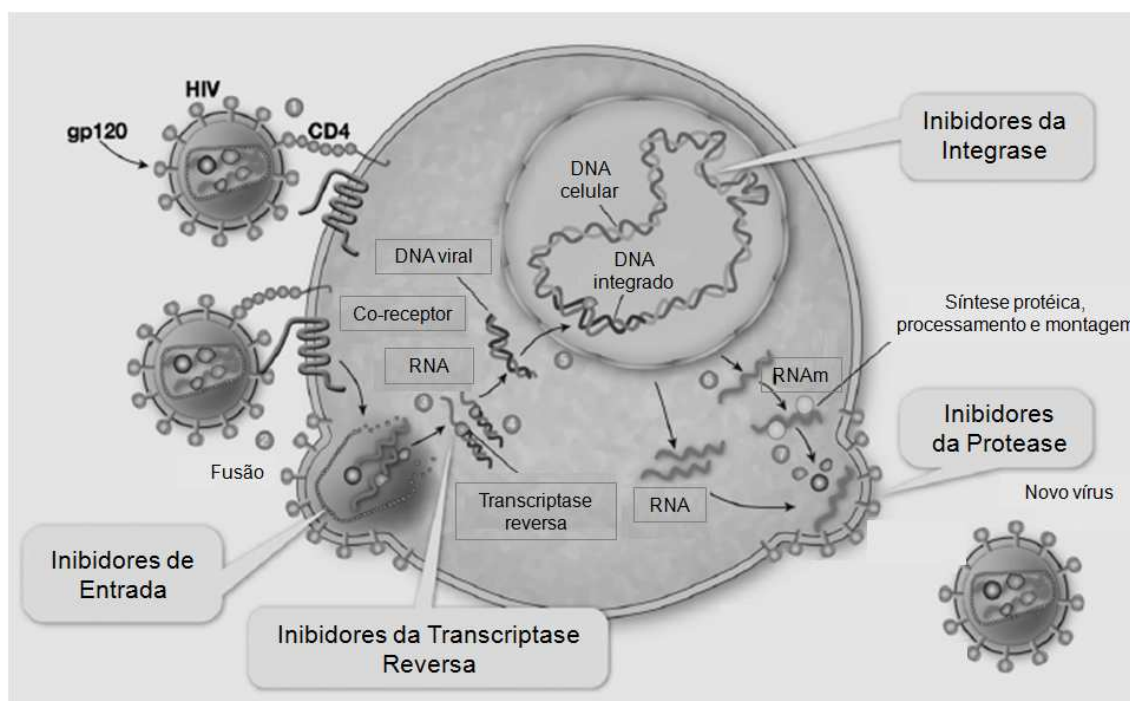


Figura 2. Ação da TARV (Adaptado de (59)).

Tabela 1. Classificação da TARV e mecanismo de ação

Classe	Nome	Mecanismo de ação
Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (ITRN)	abacavir (ABC), didanosina (DDI), estavudina (d4T), lamivudina (3TC), zidovudina (ZDV) e tenofovir (TDF); entricitabina (FTC)	Impedem a infecção das células, atuando sobre a transcriptase reversa, impedindo que o RNA viral se transforme em DNA complementar
Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeos (ITRNN)	efavirenz (EFZ), nevirapina (NVP), delavirdina (DLV); etravirina	
Inibidores de Protease (IP)	atazanavir (ATV), fosamprenavir (FPV), darunavir (DRV), indinavir (IDV), lopinavir (LPV), nelfinavir (NFV), ritonavir (RTV), saquinavir (SQV); tipranavir (TPV)	Atuam impedindo a clivagem da protease do polipeptídeo precursor viral e bloqueia a maturação do vírus
Inibidores da entrada - Fusão - Inibidor do co-receptor CCR5	enfuvirtida (T-20) maraviroque (MCV)	Impedem a entrada do material genético viral na célula Impedem que o vírus HIV se ligue ao co-receptor CCR5 da célula
Inibidor da integrase	raltegravir	Impede a integração do DNA viral ao DNA da célula

Normalmente, a TARV atual preconizada deve incluir a combinação de três ARV que podem pertencer às seguintes classes: ITRN, ITRNN e IP. As limitações das abordagens terapêuticas atuais estão na existência de muitos indivíduos infectados com intolerância aos medicamentos utilizados, ou para os quais o tratamento não é eficiente (devido ao aparecimento de vírus resistentes a estes tipos de medicamentos). Ao longo dos últimos anos, novas estratégias têm sido elaboradas com o objetivo de se obter novos fármacos mais potentes, com melhores perfis farmacocinéticos, menores efeitos colaterais e com amplo espectro de atividade a diferentes vírus HIV resistentes. Entre as classes de fármacos e o seu principal componente, podemos destacar o enfuvirtida (inibidor de fusão), o raltegravir (inibidor da integrase) e o maraviroque (bloqueia co-receptor CCR5) (57).

Apesar da significativa melhora nos parâmetros clínicos, virais e imunológicos a TARV tem sido associada com eventos adversos relacionados à toxicidade metabólica e mitocondrial (60-62). Pesquisadores têm associado a infecção do HIV e a TARV com alterações metabólicas que levam a resistência à insulina e hiperinsulinemia, dislipidemia (aumento nos níveis de triglicerídios, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e diminuição nos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL), redistribuição da gordura corporal, lipoatrofia periférica (depleção do tecido adiposo das extremidades - face, braços, pernas e nádegas) e o acúmulo de gordura visceral e central (deposição adiposa dorsocervical, aumento do abdômen, seios e tecido adiposo visceral) (63-67). Neste contexto pode também ser enquadrada a DCV, a qual tem sido descrita mais frequentemente nessa população (1, 68-70).

5 Doenças Cardiovasculares e HIV

Com o sucesso da TARV, indivíduos infectados pelo HIV estão atingindo uma maior expectativa de vida (2). Neste cenário, a DCV também ganhou importância como causa crescente de morbidade e mortalidade (3-4).

Um grande número de evidências demonstra que o risco de DCV é maior em indivíduos infectados pelo HIV, quando em comparação com pessoas não infectadas(71-75). A taxa de hospitalizações por doença cardiovascular entre indivíduos HIV positivo é significativamente maior do que a encontrada em indivíduos sem a infecção (73, 76). Estudos sugerem que a incidência de DCV é pelo menos três vezes maior em pacientes infectados pelo HIV, quando em comparação com a população em geral (77) e que o risco relativo de infarto agudo do miocárdio é de 1,75 em indivíduos infectados pelo HIV após ajuste para idade, sexo, raça, hipertensão arterial sistêmica (HAS), DM e dislipidemia (73).

As manifestações cardiovasculares em indivíduos infectados pelo HIV podem ser atribuídas à fatores genéticos individuais, fatores de risco de DCV tradicionais, efeitos adversos da TARV, à própria infecção pelo HIV, à autoimunidade, à reação imunológica diante de outras infecções virais, à inflamação crônica, à imunossupressão e à desnutrição (5-7).

5.1 Fatores de risco tradicionais para DCV

Indivíduos que desenvolvem DCV geralmente têm múltiplos fatores de risco para esta condição. Fatores de risco bem estabelecidos para DCV incluem a falta de exercício físico, obesidade, tabagismo, DM, HAS, idade avançada, dislipidemia (altos níveis de colesterol total, LDL e baixos níveis de HDL) e resistência à insulina (78). A presença de dois ou mais fatores de risco podem ter um efeito maior do que efeito aditivo no risco geral de DCV (79). Além disso, a prevalência de fatores de risco tradicionais para doenças cardiovasculares tais como tabagismo, consumo de drogas ilícitas, HAS, DM e dislipidemia é maior em indivíduos infectados pelo HIV, quando comparado com pessoas não infectadas da mesma faixa etária (73, 80-81).

5.2 Infecção pelo HIV

A presença da infecção pelo HIV por si só pode aumentar o risco cardiovascular. Inflamação induzida por infecção crônica parece contribuir diretamente para o desenvolvimento acelerado da aterosclerose (5-6, 82). A infecção pode atuar através de efeitos diretos sobre o processamento e transporte de colesterol, da atração de monócitos para a íntima da parede arterial, e ativação de monócitos induzindo uma resposta inflamatória e proliferação endotelial (83-85).

A replicação descontrolada do HIV pode ser um fator importante de risco independente para alterações no perfil lipídico, incluindo hipercolesterolemia, níveis elevados de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), triglicerídeos e baixos níveis HDL (84-86). Em indivíduos infectados pelo HIV, essas alterações lipídicas foram associadas com menor contagem de células CD4 e maiores níveis de RNA viral (84-85).

Além da dislipidemia, a infecção pelo HIV está associada a outras alterações relacionadas ao aumento do risco de DCV, como aumento de marcadores inflamatórios, o estado pró-aterogênico, hiperhomocisteinemia, alterações no stress oxidativo e nas concentrações de apolipoproteína e da lipoproteína (87).

Indivíduos infectados pelo HIV apresentam níveis mais elevados de marcadores inflamatórios como proteína C reativa (PCR) ultra-sensível, fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) e de marcadores de ativação endotelial, tais como moléculas de adesão intracelular solúvel (sICAM-1), fatores sabidamente associados a um maior risco de DCV (88-91).

5.3 Influência da Terapia antirretroviral

Apesar de uma redução na mortalidade relacionada com a AIDS, a TARV tem sido associada a efeitos adversos como alteração do perfil lipídico, com aumento do colesterol total, triglicerídios, LDL e VLDL, com diminuição do HDL, intolerância à glicose/resistência à insulina, alterações na distribuição de gordura corporal (lipodistrofia) e síndrome metabólica (64, 71, 73, 92-93). Essas alterações estão associadas na população em geral com risco aumentado de doença cardiovascular.

Um estudo realizado com 28.513 indivíduos infectados com HIV demonstra que a incidência de DCV foi significativamente maior quando comparada com indivíduos sem a infecção. O risco relativo ajustado para DCV em indivíduos recebendo o tratamento foi de 2,06 (75). A TARV, especialmente o uso de IP, foi associada com um risco aumentado de infarto do miocárdio, com um risco relativo de 1,16 ajustado por ano de exposição (72). Apesar de vários estudos sugerirem uma relação entre TARV e risco aumentado de DCV, um grande ensaio clínico randomizado, o estudo SMART, demonstra que a interrupção da TARV, mesmo que de forma temporária, está associada com um maior risco cardiovascular. Esse achado reforça a informação de que a replicação viral descontrolada, a inflamação e a diminuição das defesas estão relacionadas com um risco aumentado de DCV (94).

5.4 Outros possíveis fatores relacionados à doença cardiovascular

Além disso, muitos estudos têm demonstrado que a presença de co-morbidades e co-infecções, tais como, Hepatite viral (B e C) e doença renal podem influenciar no aumento do risco de DCV em indivíduos infectados pelo vírus HIV (95-96).

6 Disfunção Endotelial e HIV

A disfunção endotelial pode contribuir para o aumento de eventos cardiovasculares em indivíduos infectados pelo vírus HIV (10), é um evento chave inicial da aterogênese, que contribui para a progressão e manifestações clínicas da aterosclerose. Em indivíduos com doença coronariana ou cardiovascular estabelecida ou apenas com fatores de risco, a disfunção endotelial tem valor preditivo para a progressão ou surgimento de novos eventos (97-100).

Quando comparados com a população em geral, indivíduos HIV positivo sem TARV apresentam maior disfunção endotelial. Embora com menor grau de disfunção endotelial do que aqueles sem TARV, indivíduos infectados pelo HIV em TARV continuam apresentando maior grau de disfunção endotelial que a população em geral (12, 14-15, 17-18, 101-103). A disfunção endotelial em indivíduos infectados pelo HIV é similar a indivíduos com DM, em indivíduo HIV positivo com síndrome metabólica é ainda maior do que em indivíduos com apenas DM (11).

A disfunção endotelial observada em indivíduos infectados pelo HIV pode ser causada por diversos mecanismos. O vírus e as proteínas virais como gp120, tat e nef podem induzir a expressão de diversas moléculas de adesão e citocinas inflamatórias. Vários marcadores de dano endotelial como Fator Von Willebrand (vWF), moléculas de adesão E-selectina, entre outras, apresentam-se aumentados em indivíduos infectados pelo HIV (104-107). Da mesma forma, apresentam níveis plasmáticos significativamente aumentados de TNF- α e IL-6, quando comparados com indivíduos sem a infecção (16). Embora os níveis de moléculas de adesão intracelular-1 (ICAM-1), moléculas de adesão de célula vascular (VCAM-1) e vWF estejam mais altos em indivíduos infectados pelo HIV sem tratamento do que em indivíduos sem a infecção, a TARV reduz significativamente esses níveis após 5-13 meses de TARV (13, 108).

Apesar de ter alterado dramaticamente o prognóstico de vida de indivíduos HIV positivos, a TARV pode contribuir para o aumento no risco de DCV. A TARV está diretamente relacionada com o aparecimento de dislipidemia, resistência a insulina, alterações na composição corporal e síndrome metabólica. Estes efeitos podem contribuir para agravar o prejuízo ao endotélio (16). O uso de IP pode causar disfunção endotelial em artérias coronárias de suínos através do estresse oxidativo e redução da

regulação de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (109-110). Entre outros, esses efeitos podem contribuir significativamente com o surgimento de doenças vasculares.

Estudos sobre função endotelial permitem avanços nos entendimentos mais profundos dos mecanismos fisiopatológicos da doença arterial, bem como a detecção precoce da doença, quantificação de risco, e é muito interessante para a avaliação da resposta a intervenções que visam prevenir a progressão da doença ou redução de eventos. A disfunção endotelial é um marcador precoce de DCV, assim o endotélio pode ser um importante alvo para a terapia preventiva (111).

7 Ácido Fólico e Função Endotelial

Diversas estratégias farmacológicas e não farmacológicas estão sendo propostas para melhorar a função endotelial. As estratégias farmacológicas incluem o uso de estatina, inibidores da enzima de conversão da angiotensina, e reposição hormonal. Aumentar o nível de atividade física também tem sido proposto. Evidências sugerem um importante papel de fatores dietéticos na modulação da função endotelial em pacientes com risco de DCV e naqueles com DCV existente. Os focos das principais investigações nessa área são o uso de ácido graxo ômega-3, vitaminas antioxidantes, L-arginina, como também a administração de AF (19).

O AF é uma vitamina do complexo B solúvel em água. Seu nome deriva do latim “folium” (folha) porque foi isolado pela primeira vez a partir de folhas de espinafre. Os seres humanos são incapazes de sintetizar AF e, portanto, dependem de ingestão dietética para obter níveis suficientes da vitamina (112). Uma dieta saudável, com o consumo adequado de vegetais folhosos verdes escuros, frutas e sucos cítricos, leguminosas, carnes, fígado, peixes, grãos integrais e cereais fortificados, pode

fornecer as recomendações diárias de 400 microgramas de AF (113-114). O seu metabólito ativo, o 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), tem uma estrutura muito semelhante à da tetrahydrobiopterina (BH₄), um co-fator essencial do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). O ácido fólico (derivado do 5-tetrahidrofolato) é uma forma reduzida, metabolicamente ativa do folato (vitamina B9) e por não depender da diidrofolato redutase, é convertido com mais facilidade e mais rapidamente que o AF em 5-MTHF, a forma de folato presente na circulação sanguínea. Por essa razão, pode ser utilizado pelo organismo mais rapidamente e com maior eficácia do que o ácido fólico. Sua ação como uma vitamina é igual ao AF, seu efeito antioxidante se assemelha ao da vitamina E, que inibe a peroxidação lipídica (115).

Title e col. (21) demonstram que a suplementação de ácido fólico (10mg/dia) em 19 pacientes com DM pode melhorar a função endotelial desses indivíduos. Outro estudo observou uma melhora semelhante em 40 pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio, com suplementação por 6 semanas (26). Moat e col. (27) que pacientes com doença arterial coronariana, recebendo suplementação de 5mg de ácido fólico, também são beneficiados com melhora significativa da função endotelial. Estudos realizados em indivíduos tabagistas (22), com hiperhomocisteinemia (23-24), hipercolesterolemia familiar (25, 28) e com doença arterial coronariana (20, 29) também comprovam os benefícios da suplementação oral com ácido fólico sobre a função endotelial.

7.1 Mecanismos de ação do ácido fólico/derivados do folato

Muitas possibilidades podem ser consideradas para compreender o mecanismo de ação do AF (Figura 3a. e 3b.) baseado na sua rota metabólica.

7.1.1 Ação sobre homocisteína

O AF tem um conhecido efeito em reduzir os níveis de homocisteína, o qual pode contribuir para a melhora da função endotelial (24, 116). A homocisteína é um aminoácido intermediário na conversão de metionina a cisteína. Esse aminoácido é um metabólito intermediário da metionina. O AF é um fator conhecido no transporte de uma unidade ativa de monocarbono metil na conversão de homocisteína em metionina. A metionina reduz a concentração de homocisteína disponível para suportar o estresse oxidativo (117). O AF é capaz de reduzir os níveis de homocisteína em indivíduos com normo e hiper-homocisteinemia (24, 26, 118-119).

7.1.2 Redução na produção de superóxidos

A hipótese tradicional de que os efeitos do AF sobre a função vascular são principalmente devido à redução nos níveis de homocisteína tem sido contestada. Investigadores têm sugerido um efeito protetor do AF independente da redução de homocisteína (22, 28, 120). Há evidências que o AF pode exercer efeitos antioxidantes diretos e indiretos, tais como a melhora do sistema de defesa antioxidante celular (28, 121-123). O 5-MTHF, quando usado em concentrações relativamente elevadas pode reduzir a produção de superóxido (124-125) e o dano oxidativo do LDL ao ser humano (126). A deficiência de AF em ratos aumenta a peroxidação lipídica e diminui as defesas antioxidantes celulares (121-122). No entanto, considerando a potência relativamente baixa do ácido fólico/5-MTHF como antioxidante em comparação com a vitamina C, parece improvável que o efeito cardioprotetor do AF possa ser atribuído à sua ação antioxidante (125, 127).

7.1.3 Ação sobre eNOS

Na presença de quantidades suficientes do cofator BH_4 , este se liga a eNOS, resultando na produção de óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina e O_2 . Posteriormente, o NO se difunde das células endoteliais para as células musculares lisas ativando guanosina monofosfato cíclico (cGMP), o que leva ao relaxamento vascular. O estresse oxidativo pode oxidar BH_4 a sua forma inativa dihidrobiopterina (BH_2). A biodisponibilidade diminuída de BH_4 leva ao desacoplamento da eNOS com subsequente redução da formação de NO e aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (O_2^-), o que leva a disfunção endotelial (123, 128-131). Nesse sentido, o folato pode ajudar a restaurar a biodisponibilidade de BH_4 . O 5-MTHF pode aumentar a eficácia da BH_4 no desacoplamento da eNOS. Isso pode ser explicado por o 5-MTHF melhorar o estado redox ou por melhorar a afinidade de ligação da BH_4 com a eNOS (125). Além disso, o AF pode melhorar a regeneração de BH_4 da forma inativa BH_2 e pode estabilizar quimicamente BH_4 (132). Outro mecanismo possível, é o 5-MTHF ser capaz de se ligar ao sítio de eNOS e agir diretamente com eNOS independente de BH_4 (133).

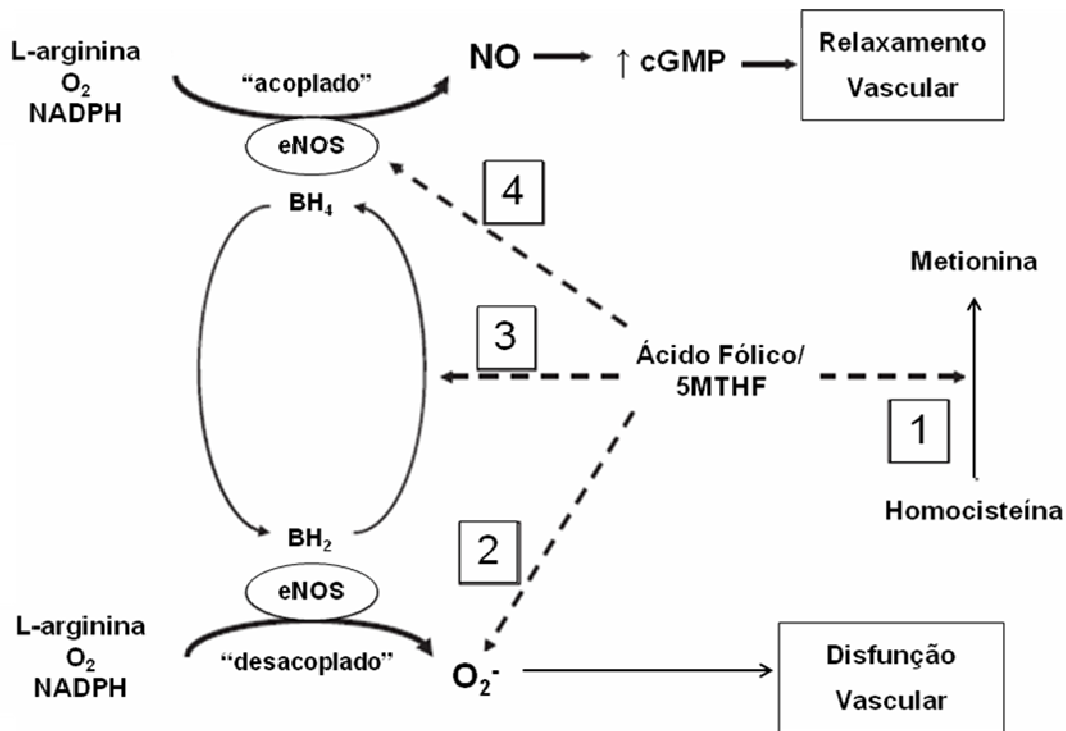


Figura 3a. Potenciais Mecanismo de ação do ácido fólico/derivados do folato (Adaptado de Moat (131)). eNOS=Óxido Nítrico endotelial sintase; ON= óxido nítrico; 5MTHF=5-metiltetrahydrofolato; BH₄=tetrahydrobiopterina; BH₂=dihydrobiopterina; cGMP=guanosina monofosfato cíclico. 1) Redução dos níveis de homocisteína, pois o folato na sua forma 5MTHF converte homocisteína em metionina; 2) Efeitos antioxidantes diretos, pode efetivamente atuar sobre O₂⁻; 3) Estabilização química ou regeneração de BH₄, agindo sobre a enzima dihydropteridina redutase (DHPR), que catalisa a regeneração de BH₄ a partir de BH₂. 4) Efeito direto sobre eNOS, pois pode melhorar a ligação de BH₄ ao sítio, além disso, os folatos contêm estruturas semelhantes a BH₄, portanto, pode se ligar diretamente ao sítio da eNOS.

7.1.4 Ação antitrombótica

A administração de AF em fumantes induz uma redução significativa nas concentrações plasmáticas de fibrinogênio e D-dímeros, marcadores de um estado pró-trombótico. No entanto, não houve associação entre esses achados e os níveis de homocisteína plasmática, o que sugere um efeito antitrombótico independente da modulação de homocisteína (134). Estudos controversos mostram que o AF possui efeitos antitrombóticos que estão ligados a uma redução dos níveis de homocisteína (135-136), por um efeito direto na eNOS ou por inibição de inúmeras vias (137).

7.1.5 Outros possíveis mecanismos de ação

Existem outros possíveis mecanismos que podem explicar o efeito benéfico do AF, porém esses foram pouco estudados, como a hipótese proposta por Moens et al. de que o fornecimento de altas concentrações de folato pode aumentar a síntese de purinas e, assim, manter os níveis de ATP no coração durante a isquemia. O folato participa da transferência de uma unidade de carbono formil de moléculas doadoras para formar purina. A perda de purinas pelo miocárdio é uma característica da isquemia. Identificar formas de prevenir a perda de purinas ou aumentar sua síntese seria um grande achado (138).

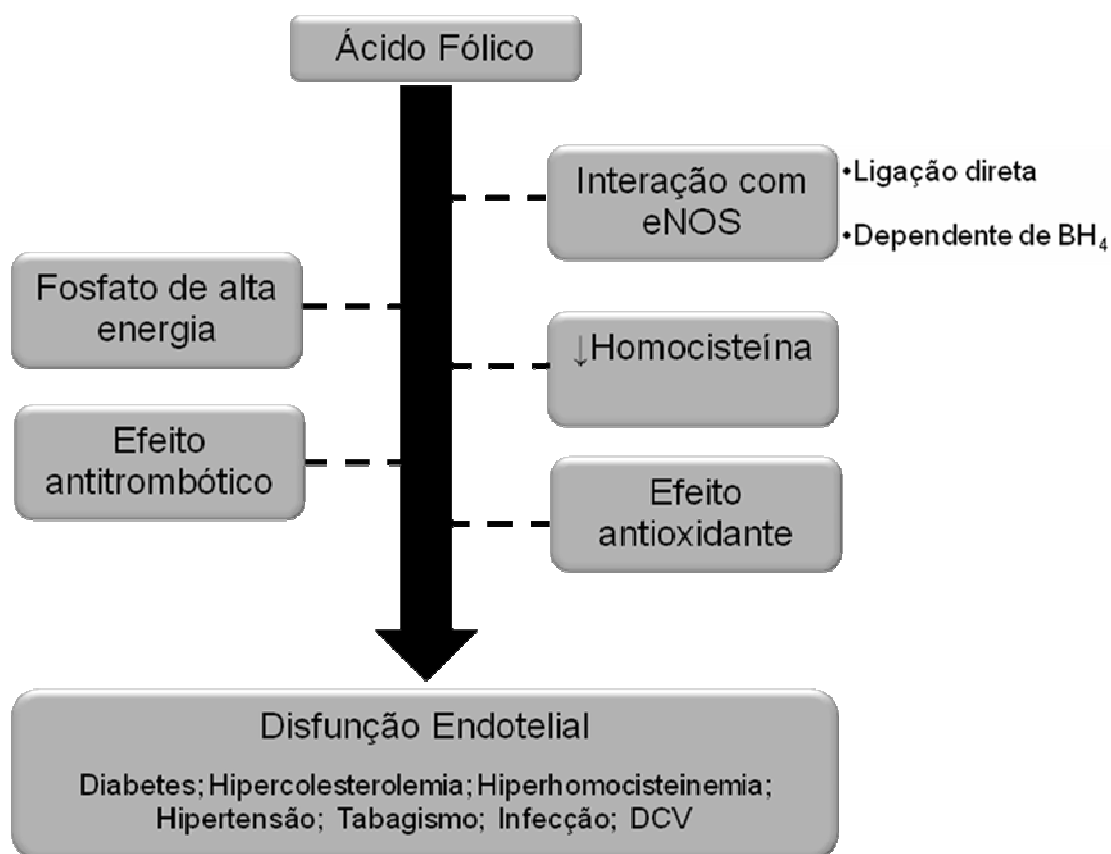


Figura 3b. Mecanismo de ação do ácido fólico (Adaptado de (139)). eNOS: óxido nítrico endotelial sintase

8 Justificativa

Como indivíduos infectados pelo HIV apresentam maior sobrevida e redução da mortalidade por complicações oportunistas e aumento da morbidade e mortalidade por DCV, não somente é importante a identificação de fatores de risco associados, bem como a identificação precoce dos indivíduos em risco. A disfunção endotelial pode contribuir para o aumento de eventos cardiovasculares em indivíduos infectados pelo vírus HIV. A disfunção endotelial é um marcador precoce de DCV, assim o endotélio pode ser um importante alvo para a terapia preventiva. A administração de ácido fólico tanto aguda como crônica têm demonstrado um benefício sobre a função endotelial de populações com diferentes riscos de DCV. No entanto, nenhum estudo avalia o efeito da suplementação de ácido fólico sobre a função endotelial de indivíduos infectados pelo vírus HIV. Se esse benefício for comprovado, a administração de ácido fólico pode ser explorada como uma terapia segura e barata para reduzir os riscos de DCV.

9 Referências

1. Barbaro G. Pathogenesis of HIV-associated heart disease. *AIDS*. 2003 Apr;17 Suppl 1:S12-20.
2. Bhaskaran K, Hamouda O, Sannes M, Boufassa F, Johnson AM, Lambert PC, et al. Changes in the risk of death after HIV seroconversion compared with mortality in the general population. *JAMA*. 2008 Jul 2;300(1):51-9.
3. Martinez E, Milinkovic A, Buirra E, de Lazzari E, Leon A, Larrousse M, et al. Incidence and causes of death in HIV-infected persons receiving highly active antiretroviral therapy compared with estimates for the general population of similar age and from the same geographical area. *HIV Med*. 2007 May;8(4):251-8.
4. Lewden C, May T, Rosenthal E, Burty C, Bonnet F, Costagliola D, et al. Changes in causes of death among adults infected by HIV between 2000 and 2005: The "Mortalite 2000 and 2005" surveys (ANRS EN19 and Mortavic). *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008 Aug 15;48(5):590-8.
5. Aberg JA. Cardiovascular complications in HIV management: past, present, and future. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009 Jan 1;50(1):54-64.
6. Arshad A, Bansal A, Patel RC. Cardiac complications of human immunodeficiency virus infection: diagnostic and therapeutic considerations. *Heart Dis*. 2000 Mar-Apr;2(2):133-45.
7. Barbaro G. Cardiovascular manifestations of HIV infection. *Circulation*. 2002 Sep 10;106(11):1420-5.
8. Barbaro G, Fisher SD, Pellicelli AM, Lipshultz SE. The expanding role of the cardiologist in the care of HIV infected patients. *Heart*. 2001 Oct;86(4):365-7.

9. Rerkpattanapipat P, Wongpraparut N, Jacobs LE, Kotler MN. Cardiac manifestations of acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med.* 2000 Mar 13;160(5):602-8.
10. Mu H, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C. Current update on HIV-associated vascular disease and endothelial dysfunction. *World J Surg.* 2007 Apr;31(4):632-43.
11. van Wijk JP, de Koning EJ, Cabezas MC, Joven J, op't Roodt J, Rabelink TJ, et al. Functional and structural markers of atherosclerosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Mar 21;47(6):1117-23.
12. Solages A, Vita JA, Thornton DJ, Murray J, Heeren T, Craven DE, et al. Endothelial function in HIV-infected persons. *Clin Infect Dis.* 2006 May 1;42(9):1325-32.
13. Wolf K, Tsakiris DA, Weber R, Erb P, Battegay M. Antiretroviral therapy reduces markers of endothelial and coagulation activation in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis.* 2002 Feb 15;185(4):456-62.
14. Stein JH, Klein MA, Bellehumeur JL, McBride PE, Wiebe DA, Otvos JD, et al. Use of human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors is associated with atherogenic lipoprotein changes and endothelial dysfunction. *Circulation.* 2001 Jul 17;104(3):257-62.
15. Blanco JJ, Garcia IS, Cerezo JG, de Rivera JM, Anaya PM, Raya PG, et al. Endothelial function in HIV-infected patients with low or mild cardiovascular risk. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jul;58(1):133-9.
16. de Larranaga GF, Petroni A, Deluchi G, Alonso BS, Benetucci JA. Viral load and disease progression as responsible for endothelial activation and/or injury in human immunodeficiency virus-1-infected patients. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2003 Jan;14(1):15-8.

17. Blum A, Hadas V, Burke M, Yust I, Kessler A. Viral load of the human immunodeficiency virus could be an independent risk factor for endothelial dysfunction. *Clin Cardiol*. 2005 Mar;28(3):149-53.
18. Andrade AC, Ladeia AM, Netto EM, Mascarenhas A, Cotter B, Benson CA, et al. Cross-sectional study of endothelial function in HIV-infected patients in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Jan;24(1):27-33.
19. Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2001 Apr;73(4):673-86.
20. Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest JJ, Jr., Nassar BA. Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Sep;36(3):758-65.
21. Title LM, Ur E, Giddens K, McQueen MJ, Nassar BA. Folic acid improves endothelial dysfunction in type 2 diabetes--an effect independent of homocysteine-lowering. *Vasc Med*. 2006 May;11(2):101-9.
22. Mangoni AA, Sherwood RA, Swift CG, Jackson SH. Folic acid enhances endothelial function and reduces blood pressure in smokers: a randomized controlled trial. *J Intern Med*. 2002 Dec;252(6):497-503.
23. Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, Brownlee M, Newcombe RG, Lewis MJ. Oral folate enhances endothelial function in hyperhomocysteinemic subjects. *Eur J Clin Invest*. 1999 Aug;29(8):659-62.
24. Woo KS, Chook P, Lolin YI, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS. Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocysteinemia. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Dec;34(7):2002-6.
25. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Loon D, Milstien S, Koomans HA, et al. Effects of oral folic acid supplementation on endothelial function in familial

hypercholesterolemia. A randomized placebo-controlled trial. *Circulation*. 1999 Jul 27;100(4):335-8.

26. Moens AL, Claeys MJ, Wuyts FL, Goovaerts I, Van Hertbruggen E, Wendelen LC, et al. Effect of folic acid on endothelial function following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2007 Feb 15;99(4):476-81.

27. Moat SJ, Madhavan A, Taylor SY, Payne N, Allen RH, Stabler SP, et al. High- but not low-dose folic acid improves endothelial function in coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. 2006 Dec;36(12):850-9.

28. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998 Jan 27;97(3):237-41.

29. Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Payne N, Durrant HJ, Lewis MJ, et al. Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering. *Circulation*. 2002 Jan 1;105(1):22-6.

30. Shirodaria C, Antoniades C, Lee J, Jackson CE, Robson MD, Francis JM, et al. Global improvement of vascular function and redox state with low-dose folic acid: implications for folate therapy in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2007 May 1;115(17):2262-70.

31. UNAIDS. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic: 2010. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)

[ISBN 978-92-9173-871-7]; Available from:

<http://www.unaids.org/en/dataanalysis/epidemiology/>.

32. BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Brasil2011; Available from:

<http://www.datasus.gov.br>

33. BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico AIDS e DST 2010. Ano VII; Available from: <http://www.aids.gov.br>.
34. Geretti AM. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis*. 2006 Feb;19(1):1-7.
35. Levy JA. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS*. 2009 Jan 14;23(2):147-60.
36. Mindel A, Tenant-Flowers M. ABC of AIDS: Natural history and management of early HIV infection. *BMJ*. 2001 May 26;322(7297):1290-3.
37. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983 May 20;220(4599):868-71.
38. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Butto S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*. 2010;46(1):5-14.
39. Adamson CS, Freed EO. Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. *Antiviral Res*. 2010 Jan;85(1):119-41.
40. Butler IF, Pandrea I, Marx PA, Apetrei C. HIV genetic diversity: biological and public health consequences. *Curr HIV Res*. 2007 Jan;5(1):23-45.
41. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Leme V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):871-2.
42. Cohen MS, Hellmann N, Levy JA, DeCock K, Lange J. The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1244-54.

43. Lal RB, Chakrabarti S, Yang C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J Med Res.* 2005 Apr;121(4):287-314.
44. Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol.* 2007 Oct;81(19):10209-19.
45. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS.* 2011 Mar 13;25(5):679-89.
46. Bello G, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Guimaraes ML, Chequer-Fernandez SL, Teixeira SL, et al. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2007 Mar;7(2):263-70.
47. Santos AF, Sousa TM, Soares EA, Sanabani S, Martinez AM, Sprinz E, et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS.* 2006 Oct 24;20(16):2011-9.
48. Soares EA, Martinez AM, Souza TM, Santos AF, Da Hora V, Silveira J, et al. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS.* 2005 Oct;19 Suppl 4:S81-6.
49. An P, Winkler CA. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet.* 2010 Mar;26(3):119-31.
50. Campbell EM, Hope TJ. Live cell imaging of the HIV-1 life cycle. *Trends Microbiol.* 2008 Dec;16(12):580-7.
51. Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet.* 2001 Nov;26(1-6):13-33.
52. Coiras M, Lopez-Huertas MR, Perez-Olmeda M, Alcamí J. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Nov;7(11):798-812.

53. UNAIDS. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. AIDS Epidemic Update: November 2009. Available from: <http://www.unaids.org>.
54. Mocroft A, Ledergerber B, Katlama C, Kirk O, Reiss P, d'Arminio Monforte A, et al. Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet*. 2003 Jul 5;362(9377):22-9.
55. Lago RFdaC, Nilson do Rosário. Dilemas da política de distribuição de medicamentos antirretrovirais no Brasil. *Ciênc Saúde Coletiva* 2010;15(3):3529-40.
56. Thompson MA, Aberg JA, Cahn P, Montaner JS, Rizzardini G, Telenti A, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA*. 2010 Jul 21;304(3):321-33.
57. Tozzi V. Pharmacogenetics of antiretrovirals. *Antiviral Res*. 2010 Jan;85(1):190-200.
58. Perez-Elias MJ, Moreno A, Casado JL, Dronda F, Antela A, Lopez D, et al. Observational study to evaluate clinical outcomes after first-line efavirenz-or lopinavir-ritonavir-based HAART in treatment-naive patients. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)*. 2009 Sep-Oct;8(5):308-13.
59. Palmisano L, Vella S. A brief history of antiretroviral therapy of HIV infection: success and challenges. *Ann Ist Super Sanita*. 2011;47(1):44-8.
60. Carr A, Cooper DA. Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet*. 2000 Oct 21;356(9239):1423-30.
61. Domingos H, Cunha RV, Paniago AM, Martins DM, Elkhoury EB, Souza AS. Metabolic effects associated to the highly active antiretroviral therapy (HAART) in AIDS patients. *Braz J Infect Dis*. 2009 Apr;13(2):130-6.
62. Montessori V, Press N, Harris M, Akagi L, Montaner JS. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. *CMAJ*. 2004 Jan 20;170(2):229-38.

63. Carr A, Samaras K, Burton S, Law M, Freund J, Chisholm DJ, et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS*. 1998 May 7;12(7):F51-8.
64. Carr A, Samaras K, Chisholm DJ, Cooper DA. Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance. *Lancet*. 1998 Jun 20;351(9119):1881-3.
65. Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, Kaufmann GR, Chisholm DJ, Cooper DA. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet*. 1999 Jun 19;353(9170):2093-9.
66. Grinspoon S. Mechanisms and strategies for insulin resistance in acquired immune deficiency syndrome. *Clin Infect Dis*. 2003;37 Suppl 2:S85-90.
67. Safrin S, Grunfeld C. Fat distribution and metabolic changes in patients with HIV infection. *AIDS*. 1999 Dec 24;13(18):2493-505.
68. Tanwani LK, Mokshagundam SL. Lipodystrophy, insulin resistance, diabetes mellitus, dyslipidemia, and cardiovascular disease in human immunodeficiency virus infection. *South Med J*. 2003 Feb;96(2):180-8; quiz 9.
69. Barbaro G. Highly active antiretroviral therapy-associated metabolic syndrome: pathogenesis and cardiovascular risk. *Am J Ther*. 2006 May-Jun;13(3):248-60.
70. Barbaro G. Reviewing the cardiovascular complications of HIV infection after the introduction of highly active antiretroviral therapy. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005 Aug;5(4):337-43.
71. Friis-Moller N, Sabin CA, Weber R, d'Arminio Monforte A, El-Sadr WM, Reiss P, et al. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003 Nov 20;349(21):1993-2003.

72. Friis-Moller N, Reiss P, Sabin CA, Weber R, Monforte A, El-Sadr W, et al. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2007 Apr 26;356(17):1723-35.
73. Triant VA, Lee H, Hadigan C, Grinspoon SK. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jul;92(7):2506-12.
74. Bozzette SA, Ake CF, Tam HK, Chang SW, Louis TA. Cardiovascular and cerebrovascular events in patients treated for human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 2003 Feb 20;348(8):702-10.
75. Currier JS, Taylor A, Boyd F, Dezii CM, Kawabata H, Burtcel B, et al. Coronary heart disease in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 Aug 1;33(4):506-12.
76. Klein D, Hurley LB, Quesenberry CP, Jr., Sidney S. Do protease inhibitors increase the risk for coronary heart disease in patients with HIV-1 infection? *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002 Aug 15;30(5):471-7.
77. Vittecoq D, Escaut L, Chironi G, Teicher E, Monsuez JJ, Andrejak M, et al. Coronary heart disease in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral treatment era. *AIDS*. 2003 Apr;17 Suppl 1:S70-6.
78. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001 May 16;285(19):2486-97.
79. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries

(the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004 Sep 11-17;364(9438):937-52.

80. Saves M, Chene G, Ducimetiere P, Leport C, Le Moal G, Amouyel P, et al. Risk factors for coronary heart disease in patients treated for human immunodeficiency virus infection compared with the general population. *Clin Infect Dis*. 2003 Jul 15;37(2):292-8.

81. Kaplan RC, Kingsley LA, Sharrett AR, Li X, Lazar J, Tien PC, et al. Ten-year predicted coronary heart disease risk in HIV-infected men and women. *Clin Infect Dis*. 2007 Oct 15;45(8):1074-81.

82. Currier JS. Update on cardiovascular complications in HIV infection. *Top HIV Med*. 2009 Jul-Aug;17(3):98-103.

83. Riddler SA, Smit E, Cole SR, Li R, Chmiel JS, Dobs A, et al. Impact of HIV infection and HAART on serum lipids in men. *JAMA*. 2003 Jun 11;289(22):2978-82.

84. El-Sadr WM, Mullin CM, Carr A, Gibert C, Rappoport C, Visnegarwala F, et al. Effects of HIV disease on lipid, glucose and insulin levels: results from a large antiretroviral-naïve cohort. *HIV Med*. 2005 Mar;6(2):114-21.

85. Hsue PY, Hunt PW, Schnell A, Kalapus SC, Hoh R, Ganz P, et al. Role of viral replication, antiretroviral therapy, and immunodeficiency in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS*. 2009 Jun 1;23(9):1059-67.

86. Das S, Shahmanesh M, Stolinski M, Shojaee-Moradie F, Jefferson W, Jackson NC, et al. In treatment-naïve and antiretroviral-treated subjects with HIV, reduced plasma adiponectin is associated with a reduced fractional clearance rate of VLDL, IDL and LDL apolipoprotein B-100. *Diabetologia*. 2006 Mar;49(3):538-42.

87. Crook M. The basis and management of metabolic abnormalities associated with cardiovascular risk in human immunodeficiency virus infection and its treatment. *Ann Clin Biochem.* 2007 May;44(Pt 3):219-31.
88. Sitia G, De Bona A, Bagaglio S, Galli L, Paties CT, Uberti-Foppa C, et al. Naive HIV/HCV-coinfected patients have higher intrahepatic pro-inflammatory cytokines than coinfecting patients treated with antiretroviral therapy. *Antivir Ther.* 2006;11(3):385-9.
89. Kristoffersen US, Kofoed K, Kronborg G, Giger AK, Kjaer A, Lebech AM. Reduction in circulating markers of endothelial dysfunction in HIV-infected patients during antiretroviral therapy. *HIV Med.* 2009 Feb;10(2):79-87.
90. Ross AC, Armentrout R, O'Riordan MA, Storer N, Rizk N, Harrill D, et al. Endothelial activation markers are linked to HIV status and are independent of antiretroviral therapy and lipodystrophy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008 Dec 15;49(5):499-506.
91. Kuller LH, Tracy R, Belloso W, De Wit S, Drummond F, Lane HC, et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med.* 2008 Oct 21;5(10):e203.
92. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998 Mar 26;338(13):853-60.
93. Grinspoon S, Carr A. Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N Engl J Med.* 2005 Jan 6;352(1):48-62.
94. El-Sadr WM, Lundgren JD, Neaton JD, Gordin F, Abrams D, Arduino RC, et al. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med.* 2006 Nov 30;355(22):2283-96.

95. Luetkemeyer AF, Havlir DV, Currier JS. Complications of HIV disease and antiretroviral treatment. *Top HIV Med.* 2010 Apr-May;18(2):57-65.
96. George E, Lucas GM, Nadkarni GN, Fine DM, Moore R, Atta MG. Kidney function and the risk of cardiovascular events in HIV-1-infected patients. *AIDS.* 2010 Jan 28;24(3):387-94.
97. Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002 Apr 2;105(13):1567-72.
98. Modena MG, Bonetti L, Coppi F, Bursi F, Rossi R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Aug 7;40(3):505-10.
99. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Oct 1;42(7):1149-60.
100. Kitta Y, Obata JE, Nakamura T, Hirano M, Kodama Y, Fujioka D, et al. Persistent impairment of endothelial vasomotor function has a negative impact on outcome in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Jan 27;53(4):323-30.
101. Bonnet D, Aggoun Y, Szezepanski I, Bellal N, Blanche S. Arterial stiffness and endothelial dysfunction in HIV-infected children. *AIDS.* 2004 Apr 30;18(7):1037-41.
102. Monsuez JJ, Dufaux J, Vittecoq D, Vicaut E. Reduced reactive hyperemia in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000 Dec 15;25(5):434-42.
103. Shankar SS, Dube MP, Gorski JC, Klaunig JE, Steinberg HO. Indinavir impairs endothelial function in healthy HIV-negative men. *Am Heart J.* 2005 Nov;150(5):933.
104. Schved JF, Gris JC, Arnaud A, Martinez P, Sanchez N, Wautier JL, et al. von Willebrand factor antigen, tissue-type plasminogen activator antigen, and risk of death

- in human immunodeficiency virus 1-related clinical disease: independent prognostic relevance of tissue-type plasminogen activator. *J Lab Clin Med.* 1992 Sep;120(3):411-9.
105. Lafeuillade A, Alessi MC, Poizot-Martin I, Boyer-Neumann C, Zandotti C, Quilichini R, et al. Endothelial cell dysfunction in HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1992;5(2):127-31.
106. Rolinski B, Geier SA, Sadri I, Klauss V, Bogner JR, Ehrenreich H, et al. Endothelin-1 immunoreactivity in plasma is elevated in HIV-1 infected patients with retinal microangiopathic syndrome. *Clin Investig.* 1994 Mar;72(4):288-93.
107. Seigneur M, Constans J, Blann A, Renard M, Pellegrin JL, Amiral J, et al. Soluble adhesion molecules and endothelial cell damage in HIV infected patients. *Thromb Haemost.* 1997 Apr;77(4):646-9.
108. Nordoy I, Aukrust P, Muller F, Froland SS. Abnormal levels of circulating adhesion molecules in HIV-1 infection with characteristic alterations in opportunistic infections. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996 Oct;81(1):16-21.
109. Fu W, Chai H, Yao Q, Chen C. Effects of HIV protease inhibitor ritonavir on vasomotor function and endothelial nitric oxide synthase expression. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005 Jun 1;39(2):152-8.
110. Chai H, Yang H, Yan S, Li M, Lin PH, Lumsden AB, et al. Effects of 5 HIV protease inhibitors on vasomotor function and superoxide anion production in porcine coronary arteries. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005 Sep 1;40(1):12-9.
111. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007 Mar 13;115(10):1285-95.
112. Scott JM, Weir DG. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk.* 1998 Aug;5(4):223-7.

113. IOM. (Institute of Medicine). Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: National Academy Press; 1998.
114. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation*. 1999 Jan 5-12;99(1):178-82.
115. Soleimani A, Usefzadeh M, Mianehsaz E, Foroozanfard F, Nikoueinejad H, Moraveji SA, et al. Comparison of oral folic acid and folinic acid on blood homocysteine level of patients on hemodialysis. *Iran J Kidney Dis*. 2011 Jan;5(1):45-9.
116. Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE, Perkins LL, Go RC, Alvarez JO, et al. Plasma homocyst(e)ine, folate, and vitamin B-12 concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. *Am J Clin Nutr*. 1994 Apr;59(4):940-8.
117. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*. 1996 Jul 1;98(1):5-7.
118. Assanelli D, Bonanome A, Pezzini A, Albertini F, Maccalli P, Grassi M, et al. Folic acid and vitamin E supplementation effects on homocysteinemia, endothelial function and plasma antioxidant capacity in young myocardial-infarction patients. *Pharmacol Res*. 2004 Jan;49(1):79-84.
119. Woodman RJ, Celermajer DE, Thompson PL, Hung J. Folic acid does not improve endothelial function in healthy hyperhomocysteinaemic subjects. *Clin Sci (Lond)*. 2004 Apr;106(4):353-8.
120. Mangoni AA, Sherwood RA, Asonganyi B, Swift CG, Thomas S, Jackson SH. Short-term oral folic acid supplementation enhances endothelial function in patients with type 2 diabetes. *Am J Hypertens*. 2005 Feb;18(2 Pt 1):220-6.

121. Durand P, Prost M, Blache D. Pro-thrombotic effects of a folic acid deficient diet in rat platelets and macrophages related to elevated homocysteine and decreased n-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis*. 1996 Apr 5;121(2):231-43.
122. Henning SM, Swendseid ME, Ivandic BT, Liao F. Vitamins C, E and A and heme oxygenase in rats fed methyl/folate-deficient diets. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(6):936-42.
123. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 4;95(16):9220-5.
124. Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Lang D, Newcombe RG, Kredan MB, et al. Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Jul;21(7):1196-202.
125. Stroes ES, van Faassen EE, Yo M, Martasek P, Boer P, Govers R, et al. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res*. 2000 Jun 9;86(11):1129-34.
126. Nakano E, Higgins JA, Powers HJ. Folate protects against oxidative modification of human LDL. *Br J Nutr*. 2001 Dec;86(6):637-9.
127. Tian R, Ingwall JS. How does folic acid cure heart attacks? *Circulation*. 2008 Apr 8;117(14):1772-4.
128. Cosentino F, Katusic ZS. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation*. 1995 Jan 1;91(1):139-44.
129. Heinzl B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J*. 1992 Feb 1;281 (Pt 3):627-30.

130. Kinoshita H, Tsutsui M, Milstien S, Katusic ZS. Tetrahydrobiopterin, nitric oxide and regulation of cerebral arterial tone. *Prog Neurobiol.* 1997 Jul;52(4):295-302.
131. Moat SJ, Doshi SN, Lang D, McDowell IF, Lewis MJ, Goodfellow J. Treatment of coronary heart disease with folic acid: is there a future? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Jul;287(1):H1-7.
132. Kaufman S. Some metabolic relationships between biopterin and folate: implications for the "methyl trap hypothesis". *Neurochem Res.* 1991 Sep;16(9):1031-6.
133. Hyndman ME, Verma S, Rosenfeld RJ, Anderson TJ, Parsons HG. Interaction of 5-methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin on endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Jun;282(6):H2167-72.
134. Mangoni AA, Arya R, Ford E, Asonganyi B, Sherwood RA, Ouldred E, et al. Effects of folic acid supplementation on inflammatory and thrombogenic markers in chronic smokers. A randomised controlled trial. *Thromb Res.* 2003 Apr 15;110(1):13-7.
135. Hjemdahl P. Smoking, nicotine and thrombotic risk--a role for platelet dependent thrombin generation? *Eur Heart J.* 2001 Jan;22(1):16-8.
136. Kuch B, Bobak M, Fobker M, Junker R, von Eckardstein A, Marmot M, et al. Associations between homocysteine and coagulation factors--a cross-sectional study in two populations of central Europe. *Thromb Res.* 2001 Aug 15;103(4):265-73.
137. Harpel PC, Zhang X, Borth W. Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis. *J Nutr.* 1996 Apr;126(4 Suppl):1285S-9S.
138. Moens AL, Champion HC, Claeys MJ, Tavazzi B, Kaminski PM, Wolin MS, et al. High-dose folic acid pretreatment blunts cardiac dysfunction during ischemia coupled to maintenance of high-energy phosphates and reduces postreperfusion injury. *Circulation.* 2008 Apr 8;117(14):1810-9.

139. Moens AL, Vrints CJ, Claeys MJ, Timmermans JP, Champion HC, Kass DA. Mechanisms and potential therapeutic targets for folic acid in cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 May;294(5):H1971-7.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

1.1 Objetivo principal

- Avaliar o efeito da suplementação de ácido fólico sobre a função endotelial de indivíduos infectados pelo HIV.

1.2 Objetivo secundário

- Verificar os efeitos da suplementação de ácido fólico sobre os níveis de homocisteína de indivíduos infectados pelo HIV.

CAPÍTULO IV

ARTIGO ORIGINAL

SHORT TERM FOLINIC ACID SUPPLEMENTATION IMPROVES ENDOTHELIAL FUNCTION IN HIV-INFECTED INDIVIDUALS: A RANDOMIZED TRIAL

INTRODUCTION

The introduction of antiretroviral therapy (ART) has changed the course of human immunodeficiency virus (HIV) infection (1), dramatically reducing the morbidity and mortality associated to HIV (2). However, along with the longer life expectancy of HIV infected individuals, non-AIDS related diseases are being increasingly recognized. In this scenario, cardiovascular disease (CVD) is one of the leading causes of morbidity and mortality in such patients. (3-4), and the possible mechanisms of the increased incidence could be related to endothelial cell damage and vascular dysfunction encountered in this population (5-10). Endothelial dysfunction is an early marker of atherosclerosis and has predictive value for cardiovascular events (11).

Therefore it should be important to early identify and aggressively manage individuals with endothelial dysfunction. Therapeutic strategies might be taken upon recognition of any vascular injury. Many reports have shown that supplementation with folates improves endothelium dependent vasodilatation in patients with hypertension (12), coronary artery disease (13-14), peripheral vascular disease (15), familial hypercholesterolemia (16-17), hyperhomocysteinemia (18-20), and diabetes mellitus (21-23). All of these conditions may be present in HIV infected individuals (24-25).

Nevertheless, there is still no study evaluating the effect of folic acid supplementation on the endothelial function of these patients. Therefore, the purpose of this study was to determine whether 4 weeks of folic acid supplementation (5 mg/day) would improve endothelial function, as assessed by brachial artery reactive hyperemia in HIV infected people.

SUBJECTS AND METHODS

Design and participants

This was a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Eligible participants were individuals with known HIV disease according to Centers for Disease Control revised criteria (26), aged 18 or over, on ART for at least 6 months, with undetectable viral load (less than 50 copies/ml), and CD4 counts more than 200 cells/mm³. Exclusion criteria were diabetes mellitus, acute or chronic infection, liver disease, renal disease, history of cardiovascular disease, or uncontrolled hypertension, pregnancy, use of illicit drug and mental illness that would compromise understanding and collaboration with the study. Patients currently using tobacco, taking any dietary supplement (such as folic acid or antioxidant) or women taking hormone replacement therapy were also excluded. All medications in regular use were maintained throughout the study period. The protocol was approved by the committee for ethics in research of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and all participants gave written informed consent.

Study settings

The study took place at the HIV outpatient clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a national reference center for acquired immunodeficiency syndrome in southern Brazil, from August 2009 to September 2011.

Interventions

Participants were randomly assigned to a 4-week treatment with either folic acid (n=15) or placebo (n=15). The study supplementation regimens consisted of the capsules contain 5 mg of folic acid or placebo. Participants were provided with 1 bottle, which contained 30 capsules. Subjects were instructed to take 1 capsule daily, in the morning.

Outcomes

The primary outcome measure was assessment of brachial artery vascular responses during reactive hyperemia. Secondary outcomes were the changes on the biochemical and hemodynamic variables.

Vascular measurements

After an overnight fast, the assessments were performed in a temperature-controlled (20-22°C), quiet room, with subjects in the supine position. Throughout the protocol, blood pressure (BP) and heart rate were measured in the dominant arm using a calibrated oscillometric automatic device (Dinamap 1846 SX/P; Critikon, Florida, USA). Forearm blood flow was measured by venous occlusion plethysmography (D.E Hokanson, Washington, USA), in the nondominant limb, as previously described (27). In short, a rapid inflator cuff was used in the upper arm to occlude venous outflow and hand circulation was arrested by placing a cuff around the wrist. Recordings were made each minute for 2 minutes. Reactive hyperemia (RH) was induced by placing a cuff in the upper-arm at 250 mmHg, and releasing after 5 min. All flow recordings were manually traced by an operator who was blinded to the groups, and time. The reproducibility of flow measurements in our laboratory has intraday and interday coefficients of variation of 6.9 and 9.2%, respectively (28). After 15 minutes of rest, 2.5 mg of sublingual isosorbide dinitrate (Isordil®/ Sigma/Brazil), was administered as an

endothelium-independent vasodilator. Five minutes later, endothelium-independent vasodilatation of the brachial artery was measured (29).

Laboratory measurements

All samples were obtained after an overnight fast, before and after 4 weeks of intervention. For each subject, total plasma homocysteine concentration, serum folate, vitamin B₁₂, glucose, creatinine, total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and triglycerides were measured. Serum folate and vitamin B₁₂ levels were measured by a competitive immunoassay using direct chemiluminescent technology (Bayer ADVIA Centaur, Leverkusen, Germany). Plasma homocysteine levels were also measured by a competitive immunoassay using direct chemiluminescent technology (IMMULITE 2000 Siemens, Illinois, USA). Glucose, creatinine, total cholesterol, HDL-c, and triglycerides were measured with standard laboratory methods.

Sample size and randomization

Based on a previous study (14), power calculations showed that a total number of 15 participants per group would be able to detect a change of 4ml/min/100ml in vascular response during reactive hyperemia between groups, with a power of 80% and $\alpha=0.05$. For allocation of the participants, randomization was achieved by computer-generated list of random numbers, and the codes remained unknown to the investigators and participants until the study was completed. Participants were randomly assigned to placebo or folic acid treatment groups. The randomization procedure was performed in three blocks of 10 and was stratified according to sex, to ensure a relatively equal number of men and women in each treatment group.

Folic acid and placebo capsules were indistinguishable in shape, size, as well as color. They were pre-packed in identical bottles and consecutively numbered for each patient, according to the randomization schedule. Supplements were coded so that

neither the investigators nor the participants were aware of the contents. A person not affiliated with the study was the only one entrusted with the identification codes for the individually wrapped bottles of capsules.

Statistical analysis

All variables were tested for normal distribution with the Kolmogorov-Smirnov test. Normally distributed variables are expressed as mean \pm SEM. Variables non-normally distributed are presented as median (25th-75th percentiles). Baseline comparisons of group characteristics were carried out by unpaired t-test or Mann-Whitney U test. To compare responses after 4 weeks of intervention, a two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures (group, time, and interaction) was used. Associations between changes in serum folic acid and changes in RH and associations between changes in plasma homocysteine and changes in RH were evaluated by Spearman's rank correlation coefficient. A two-tailed P value of less than 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Patients

Figure 1 presents the flow of patients in the study. Out of a total of 1,332 participants screened for eligibility, 1,157 had exclusion criteria. Eighty-three participants could not be enrolled due to logistical reasons, 55 did not provide consent, and 11 participants were involved in other research protocols. Of the 30 patients randomized to the folic acid and placebo groups, there were no losses to follow-up during the study period. Therefore, after 4 wks, 15 patients in the folic acid group and 15 patients in the placebo group were analyzed. No adverse events were encountered.

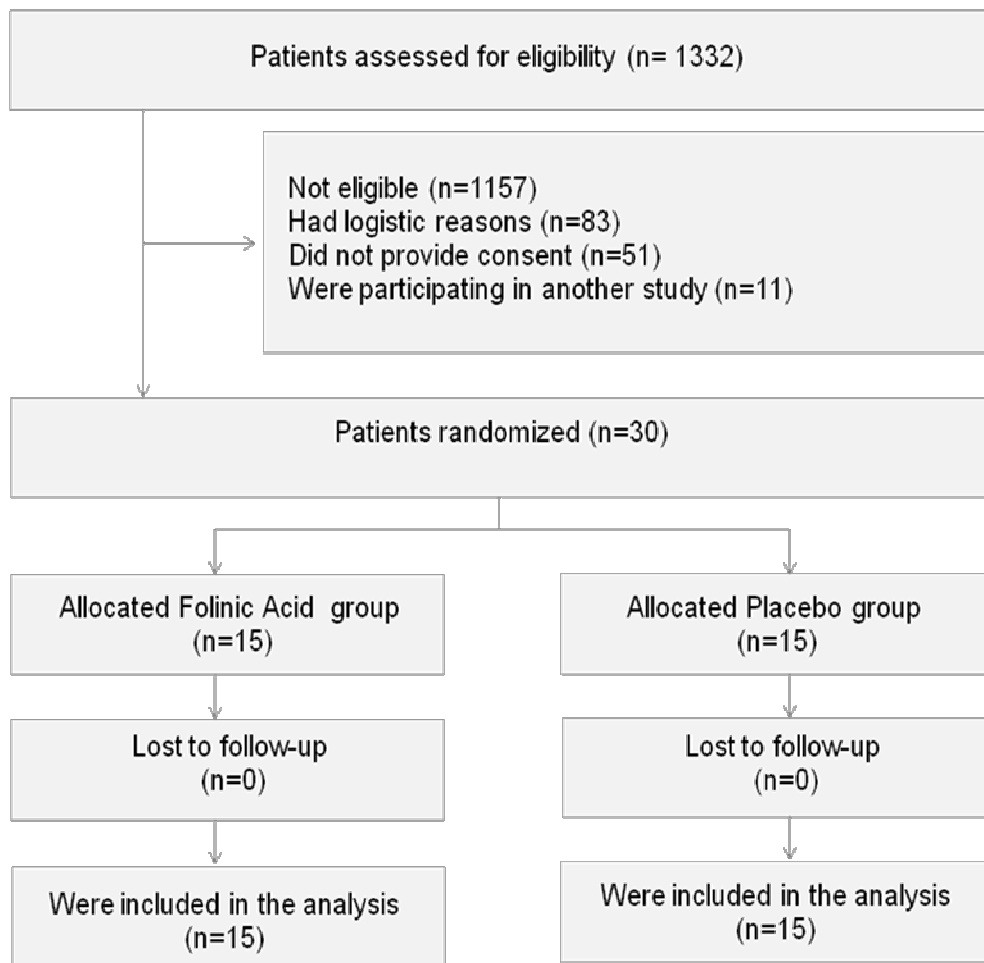


Figure 1. Participants diagram flow

Baseline characteristics

Table 1 presents the demographic, anthropometric, and biochemical characteristics, as well as the hemodynamic findings and medications used by the two groups at baseline. Groups were well matched for age and sex distribution. Likewise, other general characteristics and use of ART were similar. Participants were middle-aged, with predominance of women.

Table 1. Subject's characteristics

	Placebo (n=15)	Folinic acid (n=15)	<i>p</i> -value
Age (years)	45±2	45 ±2	0.851
Gender (M:F)	7/8	7/8	
HIV duration (years)*	13 (5-16)	10 (6-14)	0.427
Antiretroviral Therapy			
PIs**	7 (46.7%)	9 (60.0%)	
NRTI**	14 (93.3%)	15 (100.0%)	
ITRNN**	9 (60.0%)	8 (53.3%)	
Weight (kg)	70.7±2.3	70,4±2.4	0.94
BMI (kg/m2) (kg/m2)*	23,9 (23,1-27,3)	23,9 (22,5-29,2)	0.934
CD4 count (cells/ mm3)*	523 (445-585)	708 (412-871)	0.590
Systolic BP (mm Hg)	122±6	129±5	0.371
Diastolic BP (mm Hg)	75±3	75±2	0.953
Heart rate (bpm)	70±2	68±3	0.528
Total cholesterol (mg/dL)	172±14	205±11	0.078
HDL cholesterol (mg/dL) *	40 (34-51)	47 (37-56)	0.339
Triglycerides (mg/dL)*	134 (74-247)	181 (145-213)	0.431
Blood glucose (mg/dL)	101±3	99±4	0.594
Creatinine (mg/dL)	0.79±0.04	0.81±0.07	0.757
Vitamin B12 (pg/l)*	332 (304-465)	394 (320-500)	0.372
Serum folate (ng/l)	10.4±1.0	9.6±0.7	0.514
Homocysteine (umol/L)*	9.4 (7.3-10.5)	8.3 (7.6-9.9)	0.836

Data are presented as mean ± SEM or * median (25 – 75 % interquartile range) or ** number (%). M = male; F = female; PIs = Protease inhibitors; NRTI = Nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI = Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors BMI = Body mass index; BP = blood pressure; HDL = high density lipoprotein.

Hemodynamic and biochemical responses

Hemodynamic and biochemical variables at baseline and after 4 weeks are presented in Table 2. There was no significant change in hemodynamic variables. Likewise, blood glucose, lipid profile, creatinine, vitaminB₁₂ did not change significantly in the two groups after intervention. Folinic acid supplementation resulted in an increase on serum folic acid and reduction of total plasma homocystine levels.

Endothelial Function

Figure 2A shows the reactive hyperemia response at baseline and after the 4-week intervention period for both groups. Folinic acid supplementation produced a rise in endothelium-dependent vasodilation (from 14.9±0.7 to 21.2±1.4 ml/min/100ml). The same was not observed in placebo group (from 15.3±0.7 to 14.6±0.9 ml/min/100ml; group p< 0.017; time p<0.001; interaction p<0.001). Figure 2B shows the effect of the interventions on the endothelium-independent vasodilation responses before and after the 4 weeks. The endothelium-independent responses to sublingual isosorbide dinitrate remained unchanged after intervention in both groups (folinic acid: from 3.1±0.2 to 3.2±0.2 ml/min/100ml; placebo: from 2.7±0.2 to 2.8±0.2 ml/min/100ml; group p = 0.110; time p = 0.369; interaction p = 0.834).

Figure 3 shows the correlation between the change in serum folic acid levels and the change in reactive hyperemia response including both groups of patients. There was a significant correlation between the increase in serum folic acid and the improvement of RH. The correlation between the change in plasma homocysteine levels and the change in RH did not reach statistical significance (r = -0.339, p = 0.066).

Table 2. Hemodynamic and biochemical parameters at baseline and after 4 week intervention

	Placebo (n=15)		Folinic acid (n=15)		p-value		
	baseline	4 week	baseline	4 week	time	group	interaction
Systolic BP (mm Hg)	122± 6	116±5	129±5	125±4	0.008	0.260	0.595
Diastolic BP (mm Hg)	75±3	72±3	75±2	73±3	0.136	0.931	0.679
Heart rate (bpm)	70±2	70±3	68±3	65±2	0.383	0.229	0.661
Total cholesterol (mg/dL)	172±14	170±13	205±11	208±14	0.850	0.033	0.493
HDL cholesterol (mg/dL)	40 (34-51)	36 (32-46)	47 (37-56)	44 (35-55)	0.019	0.774	0.505
Triglycerides (mg/dL)	134 (74-247)	163 (80-222)	181 (145-213)	156 (104-229)	0.420	0.788	0.980
glucose (mg/dL)	101±3	95±3	99±4	96±2	0.092	0.785	0.547
Creatinine (mg/dL)	0.79±0.04	0.78±0.06	0.81±0.07	0.79±0.09	0.719	0.939	0.193
Vitamin B12 (pg/L)	332 (304-465)	393 (321-596)	394 (320-500)	418 (349-579)	<0.001	0.477	0.955
Serum folate (ng/L)	10.4±1.0	11.6±1.1	9.6±0.8	24±0	<0.001	<0.001	<0.001
Homocysteine (umol/L)	9.4 (7.3-10.5)	9.4 (7.2-10.2)	8.3 (7.6-9.9)	7.2 (6.9-8.9)	<0.001	0,526	<0.001

Data are presented as mean ± SEM or median (25 – 75 % interquartile range). BP = blood pressure; HDL = high density lipoprotein.

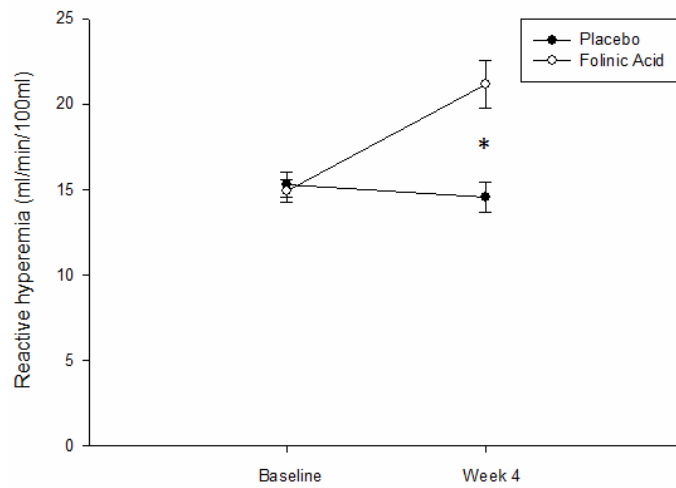


Figure 2 a) Effect of folic acid or placebo on reactive hyperemia after 4 week intervention

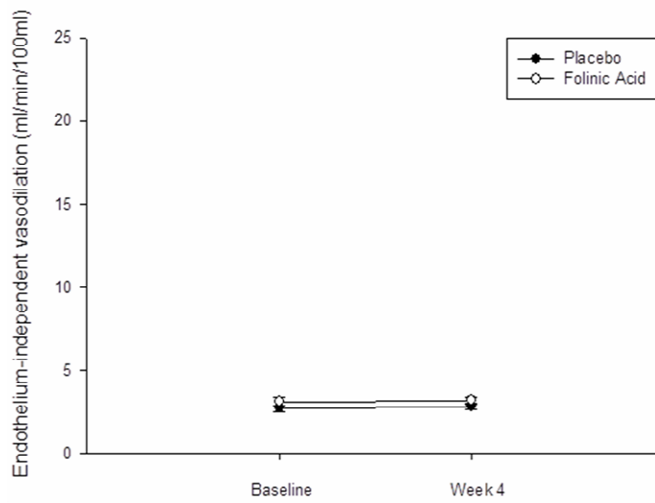


Figure 2 b) Effect of folic acid or placebo on endothelium-dependent vasodilation after 4 week intervention

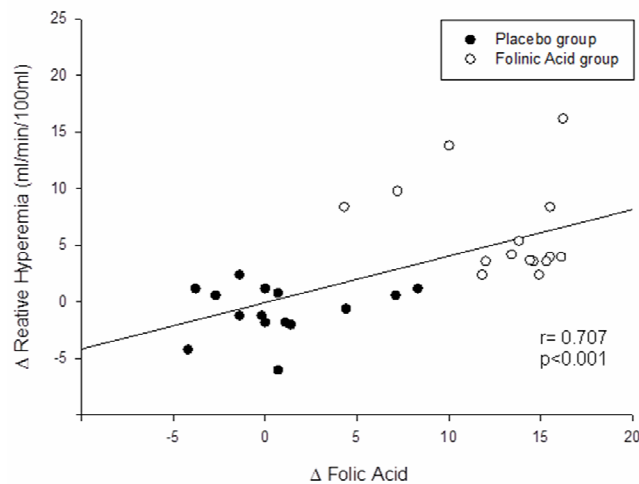


Figure 3. Correlation between the changes in serum folic acid levels and the changes in reactive hyperemia response in both groups

DISCUSSION

The main finding of this small randomized clinical trial was that 4 weeks of oral folic acid supplementation improved endothelial dependent vasodilation and reduced plasma homocysteine levels in HIV infected people. To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the effect of oral supplementation of folic acid on the endothelial function in this population. This finding is consistent with several studies that have described that folate administration improves endothelial function in various disease states, including hypercholesterolemia (16-17), hypertension (12), diabetes (21, 23), and coronary artery disease (14, 30). Currently, Dietary Recommended Intake (DRI) recommends a daily ingestion of folic acid of 400 ug (31). In the above mentioned trials, as well as in our study, folic acid was given at much larger doses. Our results extend these vascular benefits of folic acid to HIV infected people on stable antiretroviral therapy.

Both elevated plasma levels of homocysteine and low folate status are associated with increased cardiovascular risk (32-33) and endothelial dysfunction (34-35). Our

study demonstrates that folic acid supplementation resulted in higher serum folate levels and lower total plasma homocysteine levels (14.7% decrease). This is somewhat in contrast to other studies which found an almost 25% reduction (36-37). The limited decline in homocysteine levels seen in our study could be likely related to the relatively normal homocysteine levels at baseline. Of note, the greatest reductions have happened in 3 individuals with elevated baseline homocysteine in the folic acid arm. Elevated plasma homocysteine is known to occur in association with nutritional deficiencies of vitamin B₁₂ and folate in the general population (38-39). In our study participants had normal levels of both vitamins at baseline.

Previous studies suggest that chronic folic acid administration may improve lipid profile, blood pressure, and insulin resistance. We were unable to confirm these results, most likely because our patients were younger, with well controlled BP and metabolic control at baseline. A meta-analysis had shown that supplementation with at least 5mg/day of folic acid, for a minimum of 6 weeks, may reduce systolic blood pressure by an average of 2 mmHg (12). In a randomized controlled trial, the supplementation with folate and vitamin B₁₂ for 8 weeks was associated with a significant improvement in total cholesterol and insulin resistance in elderly subjects (40). In a study with healthy overweight subjects, 12 weeks of folic acid supplementation improved insulin sensitivity (41). Additionally, supplementation with folic acid for 8 weeks lowered plasma levels of homocysteine, improved glycemic control and insulin resistance in overweight and obese men with type 2 diabetes (42).

Folic acid has potential benefits with regards to cardiovascular parameters such as endothelial function, arterial stiffness, blood pressure, and pro-thrombotic status (20, 23, 43-46). There are several mechanisms to explain the efficacy of folic acid therapy. Foliates are thought to participate in the endogenous regeneration of tetrahydrobiopterin

(47), an essential cofactor for endothelial nitric oxide synthase action, and therefore may result in increased nitric oxide production after supplementation. Nitric oxide is solely responsible for flow-induced dilation of the brachial artery in humans. Moreover, folic acid has a known homocysteine-lowering effect that could contribute to improvements in endothelial function (15, 48). Finally, folic acid itself may have a direct antioxidant effect on the endothelium and therefore could improve endothelial function (30, 49-50).

Our small, randomized trial has some limitations. Folinic acid was taken only for 4 weeks, which may not be a long enough duration for the optimal benefit. Furthermore, we did not obtain extensive dietary histories to control for other folic acid intake. However, serum folate levels increased and homocysteine levels decreased after folic acid supplementation, supporting our assumption that the 5 mg/day supplementation was responsible for the improvement in reactive hyperemia responses.

Conclusion

The present study demonstrates that the short-term administration methylated folate derivative, folinic acid, improves endothelium-dependent vasodilatation in HIV infected people. Future studies should evaluate whether long-term folinic acid supplementation would lead to a reduction in cardiovascular events in this particular population.

Acknowledgements

This study was supported in part by grants from CAPES and CNPq, Brasília, Brazil, and FIPE-HCPA, Porto Alegre, Brazil.

REFERENCE

1. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998 Mar 26;338(13):853-60.
2. Sterne JA, Hernan MA, Ledergerber B, Tilling K, Weber R, Sendi P, et al. Long-term effectiveness of potent antiretroviral therapy in preventing AIDS and death: a prospective cohort study. *Lancet.* 2005 Jul 30-Aug 5;366(9483):378-84.
3. Grinspoon S, Carr A. Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N Engl J Med.* 2005 Jan 6;352(1):48-62.
4. Friis-Moller N, Sabin CA, Weber R, d'Arminio Monforte A, El-Sadr WM, Reiss P, et al. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2003 Nov 20;349(21):1993-2003.
5. Blum A, Hadas V, Burke M, Yust I, Kessler A. Viral load of the human immunodeficiency virus could be an independent risk factor for endothelial dysfunction. *Clin Cardiol.* 2005 Mar;28(3):149-53.
6. Solages A, Vita JA, Thornton DJ, Murray J, Heeren T, Craven DE, et al. Endothelial function in HIV-infected persons. *Clin Infect Dis.* 2006 May 1;42(9):1325-32.
7. Stein JH, Klein MA, Bellehumeur JL, McBride PE, Wiebe DA, Otvos JD, et al. Use of human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors is associated with atherogenic lipoprotein changes and endothelial dysfunction. *Circulation.* 2001 Jul 17;104(3):257-62.

8. Blanco JJ, Garcia IS, Cerezo JG, de Rivera JM, Anaya PM, Raya PG, et al. Endothelial function in HIV-infected patients with low or mild cardiovascular risk. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jul;58(1):133-9.
9. de Larranaga GF, Petroni A, Deluchi G, Alonso BS, Benetucci JA. Viral load and disease progression as responsible for endothelial activation and/or injury in human immunodeficiency virus-1-infected patients. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2003 Jan;14(1):15-8.
10. Monsuez JJ, Dufaux J, Vittecoq D, Vicaut E. Reduced reactive hyperemia in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000 Dec 15;25(5):434-42.
11. Kathir K, Adams MR. Endothelial dysfunction as a predictor of acute coronary syndromes. *Semin Vasc Med.* 2003 Nov;3(4):355-62.
12. McRae MP. High-dose folic acid supplementation effects on endothelial function and blood pressure in hypertensive patients: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *J Chiropr Med.* 2009 Mar;8(1):15-24.
13. Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest JJ, Jr., Nassar BA. Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Sep;36(3):758-65.
14. Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Payne N, Durrant HJ, Lewis MJ, et al. Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering. *Circulation.* 2002 Jan 1;105(1):22-6.
15. Van den Berg M, Boers GH, Franken DG, Blom HJ, Van Kamp GJ, Jakobs C, et al. Hyperhomocysteinaemia and endothelial dysfunction in young patients with peripheral arterial occlusive disease. *Eur J Clin Invest.* 1995 Mar;25(3):176-81.

16. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998 Jan 27;97(3):237-41.
17. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Loon D, Milstien S, Koomans HA, et al. Effects of oral folic acid supplementation on endothelial function in familial hypercholesterolemia. A randomized placebo-controlled trial. *Circulation*. 1999 Jul 27;100(4):335-8.
18. Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, Brownlee M, Newcombe RG, Lewis MJ. Oral folate enhances endothelial function in hyperhomocysteinaemic subjects. *Eur J Clin Invest*. 1999 Aug;29(8):659-62.
19. Woo KS, Chook P, Lolin YI, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS. Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocystinemia. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Dec;34(7):2002-6.
20. Chambers JC, Ueland PM, Obeid OA, Wrigley J, Refsum H, Kooner JS. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: An effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. *Circulation*. 2000 Nov 14;102(20):2479-83.
21. Title LM, Ur E, Giddens K, McQueen MJ, Nassar BA. Folic acid improves endothelial dysfunction in type 2 diabetes--an effect independent of homocysteine-lowering. *Vasc Med*. 2006 May;11(2):101-9.
22. van Etten RW, de Koning EJ, Verhaar MC, Gaillard CA, Rabelink TJ. Impaired NO-dependent vasodilation in patients with Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus is restored by acute administration of folate. *Diabetologia*. 2002 Jul;45(7):1004-10.

23. Mangoni AA, Sherwood RA, Asonganyi B, Swift CG, Thomas S, Jackson SH. Short-term oral folic acid supplementation enhances endothelial function in patients with type 2 diabetes. *Am J Hypertens*. 2005 Feb;18(2 Pt 1):220-6.
24. Triant VA, Lee H, Hadigan C, Grinspoon SK. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jul;92(7):2506-12.
25. Saves M, Chene G, Ducimetiere P, Leport C, Le Moal G, Amouyel P, et al. Risk factors for coronary heart disease in patients treated for human immunodeficiency virus infection compared with the general population. *Clin Infect Dis*. 2003 Jul 15;37(2):292-8.
26. Schneider E, Whitmore S, Glynn KM, Dominguez K, Mitsch A, McKenna MT. Revised surveillance case definitions for HIV infection among adults, adolescents, and children aged <18 months and for HIV infection and AIDS among children aged 18 months to <13 years--United States, 2008. *MMWR Recomm Rep*. 2008 Dec 5;57(RR-10):1-12.
27. Chiappa GR, Roseguini BT, Vieira PJ, Alves CN, Tavares A, Winkelmann ER, et al. Inspiratory muscle training improves blood flow to resting and exercising limbs in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Apr 29;51(17):1663-71.
28. Umpierre D, Stein R, Vieira PJ, Ribeiro JP. Blunted vascular responses but preserved endothelial vasodilation after submaximal exercise in chronic heart failure. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009 Feb;16(1):53-9.
29. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992 Nov 7;340(8828):1111-5.

30. Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Lang D, Newcombe RG, Kredan MB, et al. Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Jul;21(7):1196-202.
31. IOM. (Institute of Medicine). *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline.* Washington, DC: National Academy Press; 1998.
32. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ.* 2002 Nov 23;325(7374):1202.
33. Bunout D, Petermann M, Hirsch S, de la Maza P, Suazo M, Barrera G, et al. Low serum folate but normal homocysteine levels in patients with atherosclerotic vascular disease and matched healthy controls. *Nutrition.* 2000 Jun;16(6):434-8.
34. Yamamoto M, Hara H, Adachi T. Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett.* 2000 Dec 8;486(2):159-62.
35. Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA. Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation.* 1997 Mar 4;95(5):1119-21.
36. Clarke R, Halsey J, Lewington S, Lonn E, Armitage J, Manson JE, et al. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials involving 37 485 individuals. *Arch Intern Med.* 2010 Oct 11;170(18):1622-31.
37. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. *BMJ.* 1998 Mar 21;316(7135):894-8.

38. Fung TT, Rimm EB, Spiegelman D, Rifai N, Tofler GH, Willett WC, et al. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am J Clin Nutr.* 2001 Jan;73(1):61-7.
39. Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, Gaziano JM, Allen RH, Stabler SP, et al. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B6, B12, and folate. *Am J Epidemiol.* 1996 May 1;143(9):845-59.
40. Kurt R, Yilmaz Y, Ermis F, Kalayoglu Besisik S, Polat N, Elitok A, et al. Folic Acid and vitamin B12 supplementation improves coronary flow reserve in elderly subjects with vitamin B12 deficiency. *Arch Med Res.* 2010 Jul;41(5):369-72.
41. Solini A, Santini E, Ferrannini E. Effect of short-term folic acid supplementation on insulin sensitivity and inflammatory markers in overweight subjects. *Int J Obes (Lond).* 2006 Aug;30(8):1197-202.
42. Gargari BP, Aghamohammadi V, Aliasgharzadeh A. Effect of folic acid supplementation on biochemical indices in overweight and obese men with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Jul 27.
43. Mangoni AA, Sherwood RA, Swift CG, Jackson SH. Folic acid enhances endothelial function and reduces blood pressure in smokers: a randomized controlled trial. *J Intern Med.* 2002 Dec;252(6):497-503.
44. Schutte AE, Huisman HW, Oosthuizen W, van Rooyen JM, Jerling JC. Cardiovascular effects of oral Supplementation of vitamin C, E and folic acid in young healthy males. *Int J Vitam Nutr Res.* 2004 Jul;74(4):285-93.
45. Mangoni AA, Ouldred E, Swif CG, Jackson SH, Draper RP, Sherwood RA, et al. Vascular and blood pressure effects of folic acid in older patients with cardiovascular disease. *J Am Geriatr Soc.* 2001 Jul;49(7):1003-4.

46. Mangoni AA, Arya R, Ford E, Asonganyi B, Sherwood RA, Ouldred E, et al. Effects of folic acid supplementation on inflammatory and thrombogenic markers in chronic smokers. A randomised controlled trial. *Thromb Res.* 2003 Apr 15;110(1):13-7.
47. Wever RM, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F, Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Aug 18;237(2):340-4.
48. Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE, Perkins LL, Go RC, Alvarez JO, et al. Plasma homocyst(e)ine, folate, and vitamin B-12 concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. *Am J Clin Nutr.* 1994 Apr;59(4):940-8.
49. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Aug 4;95(16):9220-5.
50. Stroes ES, van Faassen EE, Yo M, Martasek P, Boer P, Govers R, et al. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2000 Jun 9;86(11):1129-34.