

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Medicina Interna

**“IMPLICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LAS ENZIMAS DEL METABOLISMO DE
LAS PIRIMIDINAS EN LOS TRASTORNOS METABÓLICOS Y MORFOLÓGICOS
ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR VIH-1 Y AL TARGA”**

TESIS DOCTORAL, 2013

Autor: María del Carmen Cabeza Brasa

Unitat de VIH

Departamento de Medicina Interna

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Director: Dr. Pere Domingo Pedrol

Unitat de VIH

Departamento de Medicina Interna

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Tutora: Mercé Gurgui Ferrer

Unidad de Enfermedades Infecciosas

Departamento de Medicina

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

**..Caminante, no hay camino
se hace camino al andar...**

Antonio Machado

A mis padres y a mi hermana Isabel

AGRADECIMIENTOS

Una tesis doctoral es la suma de la voluntad, la determinación y la perseverancia del doctorando junto con el esfuerzo de todas aquellas personas que lo rodean y sin cuya ayuda hubiera sido imposible finalizar la tarea. Es por esto que aprovecho estas líneas para agradecer de manera personalizada el apoyo recibido.

En primer lugar quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Pere Domingo, mi Director de Tesis, y a la Dra. Mercé Gurguí, mi tutora, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y por guiarme de forma inteligente a través de este período de formación. Gracias por confiar en todo momento en mí.

Quisiera agradecer al personal del Departamento de Genética su inestimable ayuda, especialmente a la Dra. Montserrat Baiget y a Juliana Salazar. Gracias por hacer fácil lo difícil.

A mis compañeros de trabajo de aquí y de allá... Gracias por su apoyo durante todo el proceso y facilitarme lo máximo posible mi dedicación en esta Tesis Doctoral.

A mis amigos que a lo largo de estos años han sabido excusar mis ausencias y me han animado a seguir adelante. Gracias por estar no sólo en los buenos momentos, por ayudarme con las figuras y por esas conversaciones interminables de Skype.

Gracias a tí que me ayudaste con el último empujón para terminar a tiempo.

A mis padres, por su apoyo incondicional durante todos los años. Gracias, con vuestro cariño todo ha sido mucho más fácil.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	10
A) Infección por el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)	11
1. Inicio de la epidemia. Implicaciones económicas y políticas de la pandemia	11
2. Características del VIH-1	15
3. Transcriptasa inversa	18
4. Ciclo vital del VIH-1	21
5. Tratamiento antirretroviral de la infección por el VIH-1	24
a) Curso clínico de la infección por VIH-1	24
b) Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITINs)	25
i. Vía metabólica de las pirimidinas	27
c) Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (ITINNs)	30
d) Inhibidores de la proteasa (IPs)	31
6. Toxicidad mitocondrial y su implicación en los efectos secundarios asociados al tratamiento antirretroviral basado en ITINs análogos de las pirimidinas	33
a) Concepto de toxicidad mitocondrial	33
b) Síndrome de lipodistrofia y otras alteraciones lipídicas	36
c) Resistencia a la insulina	40
d) Otros trastornos asociados a la toxicidad mitocondrial	42
i. Pancreatitis	42
ii. Neuropatía periférica	43
7. Reacciones adversas al tratamiento antirretroviral	47
B) Farmacogenética de las reacciones adversas asociada al tratamiento antirretroviral	48
1. Conceptos generales sobre Farmacogenética	48
2. Papel de la farmacogenética en las reacciones adversas y los efectos secundarios del tratamiento antirretroviral	50
a) Bases genéticas de la toxicidad y los efectos adversos al tratamiento antirretroviral	50
b) Genética de los enzimas de la vía de las pirimidinas	51
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	54

RESULTADOS	56
1. ARTICULO I	57
2. ARTICULO II	67
3. ARTICULO III	78
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	95

ABREVIATURAS

ABC	Abacavir
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCasa	Aspartato transcarbamoilasa
AZT	Zidovudina
AZT-TP	Zidovudina trifosfato
3TC	Lamivudina
CT	Colesterol total
CPS II	Carbamoylfosfato sintetasa II
d4T	Estavudina
ddC	Zalcitabina
ddI	Didanosina
DHOasa	Dihidroorotasa
DHODH	Dihidrooroato deshidrogenasa
dNTP	Deoxynucleosidos trifosfato (Deoxynucleoside triphosphate)
FTC	Emtricitabina
GLUT4	Transportador de glucosa 4
HALS	HAART associated lipodystrophy syndrom (síndrome de lipodistrofia asociada al tratamiento antirretroviral)
HDL-C	High density lipoprotein- cholesterol (Lipoproteína de alta densidad de colesterol)
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IPs	Inhibidores de la proteasa
ITINNs	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos
ITINs	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos
LDL-C	Low density lipoprotein- cholesterol (Lipoproteína de baja densidad de colesterol)
PNS	Polimorfismo de nucleótido simple
RAM	Reacción adversa medicamentosa
SNP	Single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleótido simple)
SREBP-1	Proteínas de unión al elemento regulador de los esteroides tipo I (siglas en inglés)

TARGA	Tratamiento antirretroviral de gran actividad
TDF	Tenofovir
TI	Transcriptasa inversa
TG	Triglicéridos
TNF	Factor de necrosis tumoral
UDVP	Usuarios de drogas por vía parenteral
UMP	Uridin monofosfato
UMPS	Uridin monofosfato sintasa
VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1
VLDL-C	Very low lipoprotein density –cholesterol (Lipoproteína de muy baja densidad de colesterol)

INTRODUCCIÓN

A) Infección por el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)

1. Inicio de la epidemia.

La primera referencia sobre la aparición de infecciones oportunistas en pacientes previamente sanos fue publicada en Junio de 1981 en el boletín médico norteamericano “Morbidity and Mortality Weekly Report” emitido por el CDC (Centres for Disease Control, centros para el control y prevención de enfermedades de EEUU, siglas en ingles). Este artículo describía los casos de cinco varones jóvenes, todos homosexuales y sin diagnósticos previos de ninguna causa conocida hasta entonces de inmunosupresión, que habían sido tratados en tres hospitales diferentes de Los Angeles por una neumonía por *Pneumocystis jirovecci* (anteriormente llamado *Pneumocystis carinii*) ^[MMWR June 5, 1981], de los cuales 2 habían fallecido. Las características que todos compartían eran la presencia de otras infecciones intercurrentes (como por ejemplo, citomegalovirus o candidiasis oral) y una función inmune celular deficitaria.

Al mismo tiempo, tanto en California como en el estado de Nueva York se comenzaron a diagnosticar casos de Sarcoma de Kaposi (SK), una enfermedad neoplásica sistémica con o sin afectación visceral que hasta entonces únicamente afectaba a hombres de mediana edad de ascendencia mediterránea y/o judía ^[MMWR July 3, 1981].

A partir de Julio de 1981, el CDC de EEUU comenzó a vigilar todos los casos de estas dos enfermedades para caracterizar una posible causa subyacente, conocer la incidencia y determinar la población en riesgo. La búsqueda inicial se centró en pacientes previamente sanos entre 15-60 años que presentaban, bien SK diagnosticado mediante pruebas de laboratorio o bien infecciones oportunistas muy graves o ambas condiciones (mayores de 15 años para evitar las inmunodeficiencias congénitas y menores de 60 para evitar los casos de SK endémico).

Poco después, a finales de 1981, se describieron los primeros casos de neumonía por *Pneumocystis* y otras infecciones oportunistas en usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP) varones heterosexuales y mujeres ^[Small]. A su vez, en NY y en Miami se describieron los primeros casos en pacientes haitianos que se habían mudado a EEUU recientemente y a primeros de 1982 se describió el primer caso de neumonía por *Pneumocystis* en un paciente con hemofilia A en Miami.

El término “SIDA” (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) fue empleado por primera vez por el CDC el 15 de Septiembre de 1982 para definir “una enfermedad, al menos moderadamente predictiva de una deficiencia en la inmunidad celular, que ocurre en personas sin causa conocida para una resistencia disminuida frente a esta enfermedad. Tales enfermedades incluían SK, PCP y otras infecciones oportunistas severas”. [Jaffe 1983].

La distribución de la enfermedad se desarrolló rápidamente a nivel mundial con un crecimiento exponencial en el número de casos diagnosticados mensualmente, pasando de 593 casos definitorios de SIDA en EEUU en Septiembre de 1982 [MMWR Sept 24, 1982] a 21.8 millones de pacientes alrededor del mundo en diciembre del año 2000. Desde el inicio de la pandemia, 1.7 millones de personas han fallecido a nivel mundial por causas relacionadas con el SIDA [UNAIDS Report 2012].

En 1982, el CDC llevó a cabo un estudio de casos y controles con 50 pacientes homosexuales y 120 controles homosexuales sanos para identificar el subconjunto de individuos con mayor riesgo de infección. Los factores de riesgo que se asociaron fueron mayor número de parejas sexuales anónimas, historia previa de varias enfermedades de transmisión sexual (ETS) y realización de prácticas sexuales unidas a un mayor riesgo de exposición a pequeñas cantidades de sangre y heces. La variable más importante resultó ser el número de parejas sexuales (60 por año en los pacientes vs 25 por año en los controles) [Jaffe 1985].

Las hipótesis sobre la etiología de este nuevo síndrome fueron inicialmente de lo más diversas. Una de ellas atribuía las infecciones al uso de amyl nitrito e isobutil nitrito (ambos conocidos inmunodepresores usados como estimulantes sexuales) que fue desestimada cuando comenzaron a aparecer casos en no-usuarios de estas drogas [Goedert]. Otra, sin embargo, dado que la mayoría de los pacientes presentaban linfadenopatías generalizadas y muchos de ellos también infección por citomegalovirus (CMV), postuló como causante de la epidemia a una cepa más agresiva de este virus. Otras teorías hablaban de una sobrecarga del sistema inmune y una especie de batalla fisiológica cuyo resultado conducía a un deterioro del propio sistema defensivo [Sonnabend // Levy 1983].

No se valoró una posible “causa infecciosa” hasta un año más tarde del comienzo oficial de la epidemia, cuando en Junio de 1982, el CDC apuntó la posibilidad de una causa de origen infeccioso transmitida por vía sexual en un “Morbidity and Mortality Weekly Report” [MMWR June 18,1982]. Posteriormente y tras la notificación de casos en diferentes grupos de riesgo (homosexuales,

heterosexuales, UDVP y hemofílicos), el CDC planteó la posible existencia de un factor transmisible a través de la sangre.

Al analizar los patrones de transmisión del nuevo agente infeccioso se llegó a la conclusión de que podría ser un virus ya que compartía similitudes con el virus de la hepatitis B. Su transmisión requería un contacto íntimo y directo entre superficies mucosas como en el caso del contacto sexual, pero a su vez también existía la transmisión por vía parenteral, como en los UDVP o en los pacientes hemofílicos que requerían la transfusión de concentrados de factor VIII ^[Dowdle].

El hecho de que el agente infeccioso se transmitiera con los productos sanguíneos empleados en el tratamiento de la hemofilia favorecía la hipótesis de que fuera un virus por ser de menor tamaño y poder atravesar los filtros a diferencia de bacterias y parásitos. Además, esta teoría podría explicar porque los linfocitos T se encontraban marcadamente disminuidos en los pacientes con SIDA, ya que podrían ser sus células diana. Los únicos agentes por aquel momento que tenían unas características similares eran los llamados retrovirus HTLV (Human T-cell Lymphotropic Virus) tipos I y II ^[Nájera]. A esto habría que añadir el descubrimiento en los años 1970s del “virus de la leucemia felina” que causaba una inmunodeficiencia general en los gatos y estaba asociado con el desarrollo de linfomas y leucemias ^[Sepkowitz].

Así, los dos grupos científicos que consiguieron finalmente aislar el virus estaban trabajando por aquel entonces con retrovirus. Montagnier y cols, publicaron en 1983 el aislamiento del virus del SIDA de un paciente con linfadenopatías, por lo que denominaron a su virus “LAV” (Lymphadenopathy-associated virus, siglas en inglés) ^[Chermann]. Al mismo tiempo, Gallo y cols se concentraron en descubrir las líneas celulares para la replicación del virus, consiguiendo, a partir de la línea celular H9, la producción de grandes cantidades de retrovirus humanos a los que denominaron HTLV-III. Esto permitió posteriormente, la elaboración de test serológicos para el cribado de las muestras sanguíneas y la producción de anticuerpos monoclonales, así como la obtención de sondas de ADN clonado para el estudio de la infección a nivel molecular ^[Weiss].

A pesar de que con el descubrimiento del virus, se comenzaron a desarrollar métodos diagnósticos y posibles tratamientos para mejorar la inmunidad de los pacientes afectados, lo cierto es que el primer fármaco más o menos efectivo tardó 6 años en ser aprobado por la FDA y la epidemia continua extendiéndose hoy en día. Actualmente, el VIH afecta a unos 34 millones de

personas, lo que supone que el 0.8% de los adultos entre 15-49 años viven con la infección ^{[UNAIDS}
Report 2012]

2. Características del VIH-1

El VIH-1 es un miembro del género Lentivirus de la familia Retroviridae. El rasgo distintivo de estos virus es su capacidad de transformar su propio material genético en forma de ácido ribonucleico (ARN) en ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante el enzima viral denominado transcriptasa inversa (TI).

Virus	Huesped	Celula primaria infectada	Enfermedad
Virus de la anemia equina infecciosa	Caballo	Macrófago	Infección cíclica en el primer año: anemia hemolítica y a veces encefalopatía
Virus Visna/Maedi	Oveja	Macrófago	Encefalopatía
Virus de la artritis-encefalomielitis caprina	Cabra	Macrófago	Inmunodeficiencia, encefalopatía
Virus de la inmunodeficiencia bovina	Vaca	Macrófago	Linfadenopatía, linfocitosis, enfermedad del SNC
Virus de la inmunodeficiencia felina	Gato	Linfocito T	Inmunodeficiencia
Virus de la inmunodeficiencia en el simio	Primate	Linfocito T	Inmunodeficiencia, encefalopatía
Virus de la inmunodeficiencia humana	Humano	Linfocito T	Inmunodeficiencia, encefalopatía

Tabla 1: Lentivirus. Traducción de: Levy JA. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus infection.

Microbiol Rev. 1993 Mar;57(1):183-289. Review.

Todos los lentivirus tienen varias características en común. Desde el punto de vista clínico, producen enfermedades con largos periodos de incubación, induciendo frecuentemente un estado de inmunosupresión que puede afectar al sistema hematopoyético y al sistema nervioso. También se han asociado con artritis y estados de autoinmunidad ^[Lewy 1993] (tabla 1).

Desde el punto de vista biológico, afectan de manera específica determinadas especies, son exógenos, no oncogénicos y producen un efecto citopatológico en determinadas células infectadas. También comparten características comunes a nivel biológico, como por ejemplo, un gen *gag* truncado con el que se procesan varias proteínas Gag, una envuelta altamente glicosilada y la presencia de genes accesorios y reguladores ^[Lewy 1993].

El virión maduro del VIH mide aproximadamente 100-120 nm de diámetro (figura 1). La envuelta del virus está formada por la membrana de la célula huésped, con proteínas de la envoltura viral como son gp120 y gp41 y proteínas propias de la célula huésped como las proteínas del

Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase II. La matriz incluida entre la envoltura y el core o núcleo está formada principalmente por la proteína p17, que es una proteína miristilada en una glicina en su amino terminal. La miristilación de esta proteína es necesaria para la producción del complejo de preintegración que se dirige al núcleo y permite al VIH-1 infectar e integrarse en las células que no se dividen como los macrófagos. Las proteínas no miristiladas producen viriones no infecciosos. Por otra parte, también tiene funciones extracelulares mediante su unión a los receptores de las células mononucleares de la sangre periférica e incrementando la producción de citoquinas proinflamatorias y contrarresta la acción de la interleuquina-4 (IL-4)^[De Francesco].

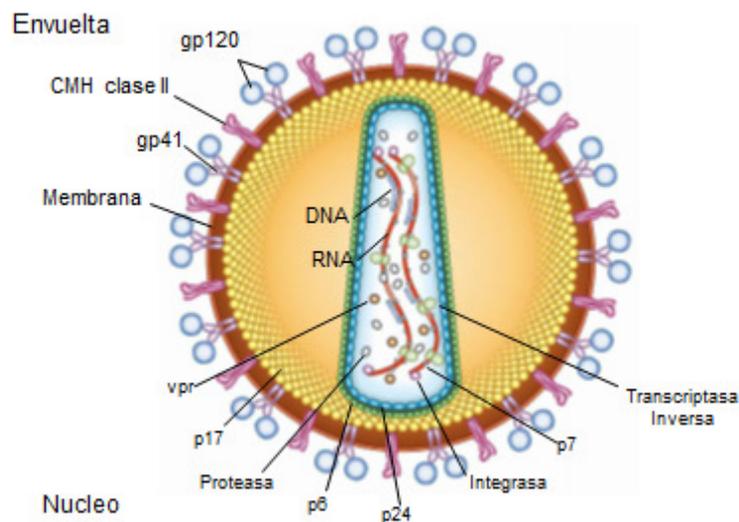


Figura 1. Estructura del virión del VIH-1. Imagen adaptada del "Structure of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) virion". Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. "Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases" 2010. Churchill Livingstone Elsevier. 7a edición pg 2326.

CMH clase II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II.

El core, de forma cónica, está formado por dos moléculas de ARN monocatenario y las proteínas necesarias para las fases iniciales de la infección. El DNA proviral del VIH-1 integrado en las células, sigue la estructura genómica básica común a todos los retrovirus y está formada por los genes *gag-pol-env* flanqueados simétricamente por dos repeticiones terminales largas (LRTs, siglas en inglés) virales completas y las secuencias celulares que representan los puntos de integración en la célula (figura 2). Estas LRTs contienen secuencias reguladoras de la transcripción, señales de procesamiento del ARN, lugares de ensamblaje y los lugares de integración^[Mandell]. Además presenta los genes reguladores *tat* y *rev* y los genes accesorios *vpr*, *vpu*, *vif* y *nef*.

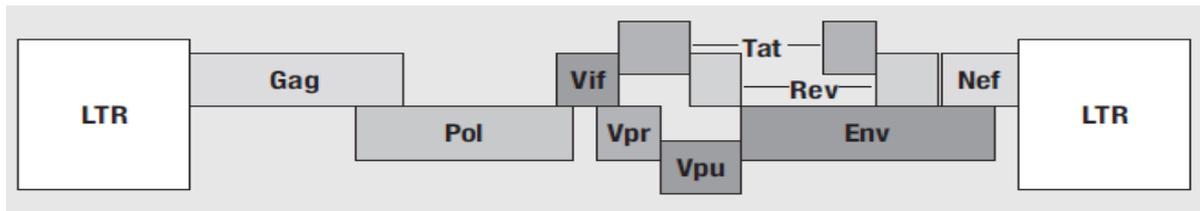


Figura 2: Organización del genoma del VIH-1. Adaptación de: Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. Ann Ist Super Sanita. 2010;46(1):5-14. Pag 6.

El gen *gag* codifica las proteínas estructurales del core (p24, p7, p6) y de la matriz (p17) y el gen *env* codifica las glicoproteínas de la envuelta gp120 y gp41 que reconocen los receptores celulares. El gen *pol* codifica los enzimas necesarios para la replicación viral que son transcriptasa inversa (TI) que convierte el RNA viral en DNA, la integrasa que incorpora el DNA viral en el DNA de la célula huésped y la proteasa que separa las proteínas Gag y Pol en sus diversos componentes.

La escisión del precursor proteico Gag por la proteasa produce los componentes estructurales del core y de la matriz virales. A partir del ARN mensajero (ARNm) viral se forma una larga poliproteína, llamada p55, que es dividida en cinco proteínas virales por la proteasa (p17, p24, p7, p1 y p2). La ausencia de función de este enzima, ya sea por la desaparición de la misma o por el efecto de los fármacos antirretrovirales, conlleva la formación de partículas virales no infecciosas.

La proteína viral Tat (Transactivador transcripcional) se une a una estructura en horquilla del ARN viral en transcripción localizado en el extremo 5'-LTR de todos los transcritos virales (conocida como TAR, elemento de respuesta a la transactivación, del inglés Transactivation Response Element). Aunque mayoritariamente actúa a nivel de la elongación transcripcional más que como iniciadora por sí misma de la transcripción. Requiere la presencia de varios cofactores para su correcto funcionamiento como son la quinasa asociada a Tat, la quinasa dependiente de ciclina 9 y la ciclina T ^[Emerman].

Rev (Regulador de la expresión viral) es una proteína que transporta los transcritos de ARN virales entre el núcleo y el citoplasma. Se sintetiza en el citoplasma y pasa al núcleo donde se une a la secuencia RRE (del inglés, Rev response element) presente en los transcritos virales no procesados y los dirige hacia el citoplasma donde pueden ser traducidos en proteínas virales por los ribosomas.

El papel de la proteína Vpr (acrónimo en inglés de proteína vírica reguladora, "Viral protein regulator") podría ser explicado por la necesidad de maximizar la producción viral durante el corto

periodo de tiempo de supervivencia de las células infectadas. Esta proteína impide la proliferación a las células infectadas produciendo que permanezcan más tiempo en la fase G2 del ciclo celular que es cuando la LTR viral es más activa por lo que se aumenta la producción viral.

La proteína Nef (“Negative factor”), es una proteína con capacidad de regular de manera negativa la actividad transcripcional del VIH-1 (de ahí su nombre). Actúa disminuyendo la expresión de CD4 en las células infectadas, principal receptor celular del VIH-1, mediante el aumento de la tasa de endocitosis de CD4 y la degradación lisosomal. Una de las ventajas de esta regulación negativa podría ser que la eliminación del exceso de CD4 facilitaría el tránsito de la proteína Env hacia la superficie celular y así la formación de nuevos viriones. También disminuye, aunque en menor grado, la expresión en la superficie celular del CHM-I, lo que afecta a la capacidad de los linfocitos T citotóxicos para eliminar las células infectadas por el VIH-1^[Yang].

Vpu (acrónimo en inglés de proteína vírica desconocida, “Viral protein unknown”), se localiza en la membrana interna de la célula y de igual modo que nef, regula negativamente la presencia de CD4. Elimina el receptor CD4 de los complejos formados por el receptor CD4 y la proteína vírica Env para que ésta pueda alcanzar la membrana celular y pueda continuar el ensamblaje de los viriones, facilitando además la liberación de los mismos de la superficie celular^[Klimkait].

Vif (factor de infectividad vírica), aumenta la infectividad del VIH-1. Es una proteína de 23 kD esencial para la replicación del VIH en los macrófagos y en los linfocitos de sangre periférica, las dianas naturales de la infección por el VIH-1. Sin embargo, existen otras células donde la proteína Vif no es tan necesaria, llamadas líneas celulares permisivas para los mutantes Vif-negativos. Los viriones producidos en este tipo de células pueden infectar células no permisivas pero estos virus no son capaces de propagar la infección^[Lecossier].

La proteasa es un enzima plenamente activo en forma de dímero formado por dos subunidades idénticas de 99 aminoácidos cada una, que se separa de manera autónoma durante el proceso de ensamblaje viral. Si no funciona esta proteína se producen partículas no infecciosas que contienen proteínas Gag no escindidas (y por tanto no funcionantes)^[Flexner].

La integrasa es el enzima que media en la integración del DNA viral bicatenario en el genoma de la célula huésped. Una vez integrado, el provirus puede ser considerado un elemento genético estable que permanecerá durante toda la vida de la célula.

3. Transcriptasa inversa (TI)

La TI es una ADN-polimerasa dependiente de ARN. Es un enzima muy versátil, pudiendo sintetizar copias de ADN tanto del ARN como de las plantillas de ADN y degradar el RNA viral de los híbridos ARN-ADN. La estructura de la TI en forma de heterodímero asimétrico con dos subunidades (p51 y p66), demuestra las bases moleculares de la resistencia a los fármacos antirretrovirales. La subunidad mayor (p66) contiene los sitios activos para ambas actividades enzimáticas (ADN polimerasa y ARNasa), mientras que la subunidad menor tiene un papel estructural. Los subdominios de la polimerasa tienen forma de mano: los dedos (residuos 1-85 y 118-155), la palma (residuos 86-117 y 156-236), el pulgar (residuos 237-318) y por último existen unos residuos de conexión (319-426). Ambas subunidades poseen los mismos dominios polimerasa y de conexión, sin embargo la posición espacial de los subdominios es diferente, por lo que mientras la subunidad p66 posee una conformación catalítica “abierta”, la subunidad p51 adopta una conformación “cerrada” con un papel básicamente estructural ^[Sluis-Cremer].

Este enzima juega un papel fundamental en la diversidad genética de los retrovirus. Se ha calculado la fidelidad de transcripción del enzima en diferentes retrovirus midiendo la tasa de incorporaciones erróneas en plantillas definidas. Para el VIH-1 esta tasa oscila entre 1:1700 y 1:4000 incorporaciones erróneas por nucleótido por replicación. En general se estima que para el genoma de 9.7kb del VIH-1, la tasa de errores *in vivo* es una incorporación errónea por ciclo de replicación ^[Davenport]. Las variantes producidas por la TI generan diversidad de secuencias que pueden emerger en determinadas condiciones, como por ejemplo, bajo la presión selectiva de la respuesta inmune o los propios fármacos antirretrovirales. Sin embargo, a su vez, esta ausencia de fidelidad, favorece el uso de los análogos de los nucleósidos para la formación del ADN viral y no del ADN celular ^[Mandell].

La TI requiere un primer o iniciador y una plantilla, como la mayoría de las ADN polimerasas. La síntesis del ADN se inicia a partir de un primer de ARN de transferencia (tARN) de la célula huésped, que en el caso del VIH-1 es tRNA_{lys3} (en inglés). En el genoma viral, cerca del extremo 5', hay un segmento de 18 nucleótidos, llamado “prime binding site” (PBS) o sitio de unión del cebador que es complementaria a los 18 nucleótidos del extremo 3' del tRNA_{lys3}. La hebra “positiva” del genoma viral sirve de plantilla, por lo que la primera hebra de ADN formada es la “negativa”. Se forma entonces un híbrido ARN/ADN que es degradado parcialmente en su hebra de ARN por las ARNasa H, manteniendo la hebra de ADN. Al ser las secuencias 3' y 5' del genoma viral iguales (LRT), la hebra

“negativa” del ADN se hibrida con la secuencia R en el extremo 3’ de una de las dos fibras de ARN del virión, constituyendo el llamado “primer salto” o transferencia de la cadena “negativa”. A partir de aquí, la síntesis de la hebra “negativa” de DNA puede continuar a lo largo del ARN viral. A la vez que la TI va sintetizando el nuevo DNA, la ARNasa H va degradando la cadena de ARN. Existe una zona cerca del extremo 3’ en el ARN viral especialmente resistente a la escisión de la ARNasa H, llamada PPT (polipurine tract, en inglés) que es empleada como primer para la síntesis de la cadena de ADN “positiva”. La síntesis de la cadena positiva se mantiene hasta que la TI comienza a copiar el primer ARNt, ya que aunque los primeros 18 nucleótidos pueden ser copiados, el siguiente nucleótido es una adenosina modificada que no puede ser transcrita por la TI. Una vez que el extremo 3’ del ARNt ha sido transcrito a ADN, se crea un nuevo híbrido ARN/ADN que es nuevamente sustrato de la ARNasa H. En la transcripción del VIH-1, la ARNasa no retira todo el primer del ARNt, excepcionalmente escinde de manera precisa un nucleótido de la unión entre el ADN y el ARNt, dejando una ribo-adenosina en el extremo 3’ de la cadena de DNA viral negativa. Este paso constituye el segundo salto o la transferencia de la cadena “positiva”. La exposición del extremo 3’ de la cadena positiva del ADN permite transferir al extremo 5’ de la cadena negativa a la hebra positiva. Una vez realizada esta segunda transferencia, ambas hebras de DNA son extendidas hasta que todo el ADN es una doble cadena, creando un ADN que tiene las mismas secuencias en ambos extremos (llamadas LTRs) ^[Sarafianos].

4. Ciclo vital del VIH-1

En el ciclo de replicación del VIH-1 se pueden distinguir dos fases, una inicial temprana que consta de 4 pasos: unión y entrada en la célula, liberación en el citoplasma, transcripción inversa e integración del provirus; y una fase tardía que dura toda la vida de la célula y que se corresponde con la síntesis y regulación de las proteínas virales y la formación de los nuevos viriones (figura 3).

La infección comienza con la unión de la gp 120 de la superficie del virión con la molécula CD4 que se encuentra en la superficie del 60% de los linfocitos T, en las células T precursoras de la médula ósea y el timo, en macrófagos y monocitos, células dendríticas y células de la microglía del sistema nervioso central. La molécula de CD4 actúa como co-receptor del complejo mayor de histocompatibilidad clase II durante el reconocimiento de un antígeno extraño por parte de la célula T ^[Miceli]. Sin embargo, esta unión no es suficiente para permitir al VIH entrar en la célula. Se ha demostrado que es necesaria también la presencia de unas pequeñas proteínas producidas por los linfocitos T CD8, llamadas quemoquinas. Cuando la proteína gp120 se une a la proteína CD4, la envoltura del virus sufre un complejo cambio estructural que permite exponer un dominio concreto donde se unen los receptores de quemoquina específicos de la membrana celular. Los dos co-receptores más frecuentes usados por el VIH-1 son el CXCR4 y el CCR5. Existen virus "M-trópicos" que pueden infectar de manera primaria macrófagos y linfocitos T CD4 y usan principalmente el ligando CCR5, otros virus llamados "T-trópicos" que infectan principalmente linfocitos T CD4 y líneas celulares T vía CXCR4 y existen virus llamado "duales" que pueden infectar las tres líneas celulares y pueden emplear ambos co-receptores ^[Gorry]. El tropismo CCR5 es el predominante en las fases inicial y crónica de la infección por el VIH-1 y ha demostrado tener un papel importante en la persistencia del VIH-1 ya que por ejemplo, los sujetos que son homocigotos para el alelo CCR5 Delta32 están protegidos de la infección ^[Samson] y el trasplante de células madre CCR5 Delta32/Delta32 ha demostrado estar asociado con un control a largo plazo de la infección ^[Hutter].

Una vez se han fusionado las membranas, el core viral entra en la célula y se libera el ARN viral en el citoplasma, donde tiene lugar la transcripción inversa.

La TI actúa de una manera ordenada y similar en todos los retrovirus, comenzando por el extremo 5' y dando lugar a una hebra de ADN negativa, como se ha explicado anteriormente. La

concentración de nucleótidos en el citoplasma puede ser un factor limitante para la transcripción, especialmente en las células que no están en fase replicativa [Mandell].

A continuación, se produce la migración hacia el núcleo del complejo de pre-integración que está formado por proteínas celulares, por proteínas víricas y tanto por el ARN viral como por el nuevo ADN vírico que se va formando en el citoplasma a la vez que éste es importado hacia el núcleo. Este proceso, dependiente de energía, emplea las señales de localización presentes en la proteína de la matriz p17, en la Vpr y en la integrasa [Mandell // Bukrinsky]. Este paso es especialmente importante, ya que el VIH-1 a diferencia de otros retrovirus, es capaz de realizar la integración a pesar de que la célula no se replique como por ejemplo en macrófagos y monocitos.

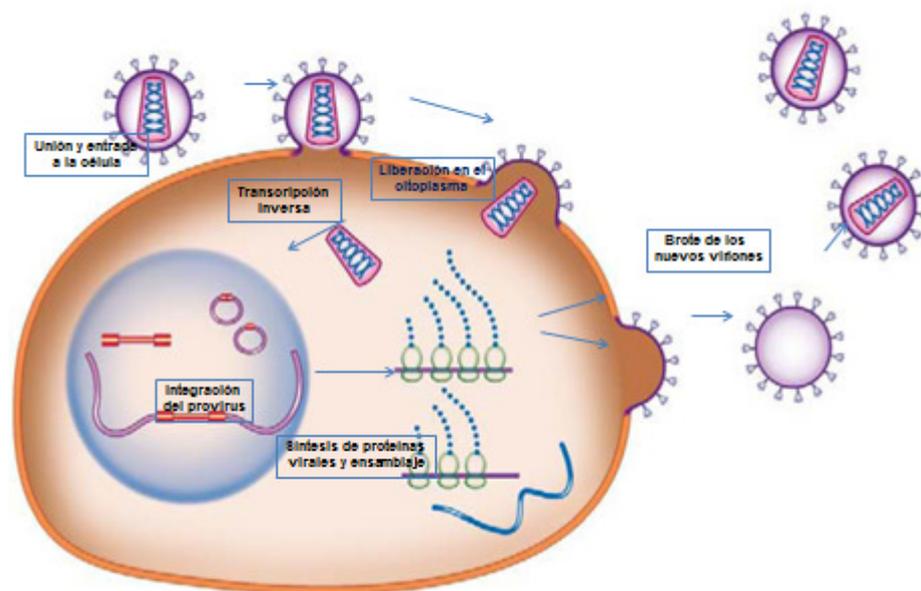


Figura 3: Ciclo vital del VIH-1. Adaptación de "The life cycle of human immunodeficiency virus type 1".

Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. "Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases"
2010. Churchill Livingstone Elsevier. 7ª edición pg 2324

Posteriormente, cuando la célula se replica, lo hace también el genoma viral y usando los enzimas celulares se lleva a cabo la síntesis de las proteínas virales. Los nuevos viriones se ensamblan y brotan de la célula infectada para madurar en el exterior y poder infectar nuevas células. Los factores que precipitan la producción de virus por la activación de los promotores virales pueden ser tanto víricos como celulares. Así por ejemplo, factores externos como coinfección con

otros agentes, la producción de citokinas pro-inflamatorias y la propia activación celular pueden aumentar la replicación viral [Honda et al// Kawakami 1988] .

El brote de los nuevos viriones se realiza en microdominios especializados de la membrana celular que se caracterizan por una composición lipídica diferente, con altas concentraciones de colesterol, esfingolípidos y glicolípidos [Liao].

5. Tratamiento antirretroviral de la infección por VIH-1

a) Curso clínico del VIH-1

El curso de la infección por el VIH-1 sin tratamiento abarca alrededor de 10 años (figura 4). Las fases que comprende son la infección primaria, la diseminación a los órganos linfoides, el periodo de latencia clínica, el aumento de expresión del VIH-1, la enfermedad clínica y la muerte. En los pacientes no tratados la muerte acontece normalmente a los 2 años del inicio de los síntomas.

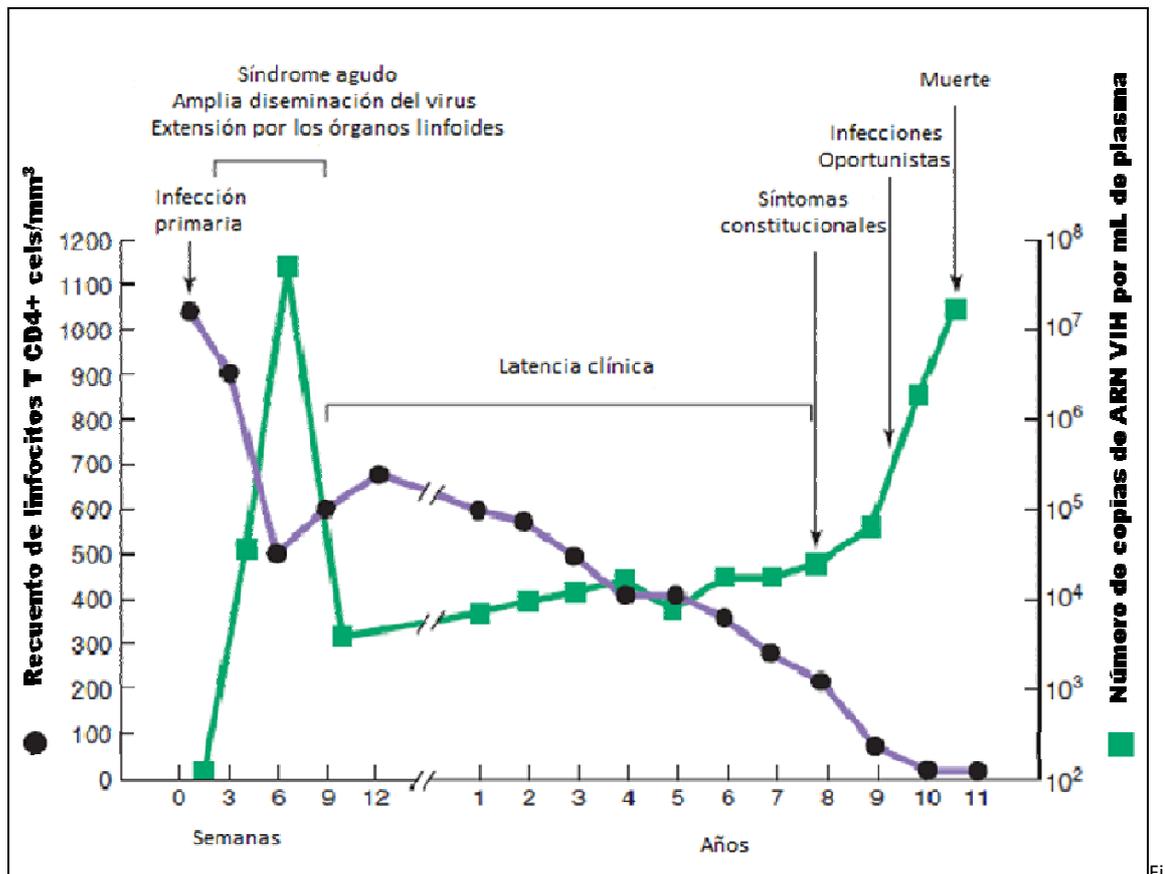


Figura 4: Curso de la infección por el VIH-1 no tratada. Adaptación de la figura tomada de: de Fauci AS. Pathogenesis and New Prevention Interventions. CID 2007;45 (Suppl 4) pag S208.

Después de la infección primaria existe un periodo de entre 4 y 11 días entre la infección de la mucosa y la viremia inicial. La viremia es detectable alrededor de 8-12 semanas después de la infección. El virus se extiende ampliamente por el cuerpo en este periodo, incluyendo los órganos linfoides. Muchos pacientes (hasta un 50-75%) desarrollan un síndrome mononucleosis-like (fiebre, rash cutáneo, mialgias y faringitis) entre 3 y 6 semanas después de la infección aguda. Existe una importante caída en el recuento de linfocitos T CD4 inicial, pero entre 1-3 semanas después se desarrolla una respuesta inmune frente al VIH-1 que ocasiona una disminución de la carga viral y el

consiguiente aumento de la cifra de linfocitos T CD4. A pesar de esta respuesta, el sistema inmune no es capaz de eliminar completamente la infección, ya que el virus persiste en los órganos linfoides.

El periodo de latencia puede durar hasta 10 años. Durante este tiempo existe una replicación continua del VIH-1, se estima que cada día unos 10 billones de partículas de VIH son producidas y destruidas ^[Brooks]. La vida media del virus en plasma es alrededor de 6 horas. El ciclo de vida del virus (desde que infecta una célula hasta que se producen los nuevos viriones que infectarán otras células) es de alrededor de 2.6 días y mientras que los linfocitos T CD4 que tienen unas tasas de recambio similares cuando están "sanos", cuando están infectados su vida media se reduce a 1.6 días.

Los pacientes con viremias más elevadas progresan hacia fases sintomáticas más rápidamente que aquellos que presentan viremias bajas. Durante el periodo de latencia la reducción de CD4 es aproximadamente -50 cels/mm^3 . Las infecciones oportunistas y las neoplasias asociadas al SIDA aparecen cuando la cifra de CD4 se encuentra por debajo de 200 cels/mm^3 .

La infección se suele establecer por una única variante del virus (normalmente M-trópica). Sin embargo la tasa de error de la transcriptasa inversa es tan elevada que pronto se acumulan "cuasiespecies". El cambio de tropismo del virus hacia T-trópico se acompaña normalmente de mayor virulencia y mayor efecto citopático y por tanto, de progresión a la fase sintomática de SIDA.

El tratamiento antirretroviral logra evitar la progresión a SIDA y aumentar tanto la esperanza como la calidad de vida de los pacientes.

b) Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIN)

Debido a que la transcripción del material genético es un paso clave en el desarrollo de la enfermedad, al inicio de la pandemia los investigadores comenzaron a desarrollar fármacos que inhibían la acción de la TI, los llamados inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITINs). ^[Stein//Martin].

El primer fármaco que se empleó para controlar la enfermedad fue la zidovudina (AZT), desarrollada a mediados de la década de los 60 como agente antitumoral. Se observó que su metabolito trifosfato (AZT-TP) competía con los nucleósidos endógenos para la síntesis del DNA proviral, finalizando la cadena de producción del DNA e inhibiendo la actividad de la TI ^[Cihlar].

Posteriormente se han desarrollado hasta 7 inhibidores de los nucleósidos como son didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), estavudina (d4T), lamivudina (3TC), abacavir (ABC), emtricitabina (FTC) y un inhibidor de los nucleótidos: tenofovir disoproxilfumarato (TDF).

A pesar del desarrollo de nuevas familias de fármacos antirretrovirales, los ITINs son el pilar sobre el que se asientan las diferentes pautas de tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA), adquiriendo mayor importancia en los países subdesarrollados donde en algunos casos son los únicos antirretrovirales disponibles ^[El-Khatib Z, AIDS Clin Res. 2011 // El-Khatib Z, BMC Public Health. 2011 // McIntyre].

Los nucleósidos están formados por la unión de una base nitrogenada y una pentosa. Al unirse un grupo fosfato, obtenemos los nucleótidos, que son los componentes moleculares básicos del ADN y del ARN. Los nucleótidos pueden ser análogos de las purinas (adenina y guanina) o de las pirimidinas (timina, uracilo y citosina).

Prácticamente todos los organismos pueden sintetizar *de novo* los nucleótidos de purina y pirimidina en cantidades suficientes para satisfacer sus necesidades a partir del nitrógeno de algunos aminoácidos y de la ribosa - 5-fosfato. Sin embargo, también es posible la síntesis a partir de los nucleósidos o las bases nitrogenadas obtenidas por la degradación de los ácidos nucleicos en el aparato digestivo, que es la denominada síntesis de rescate.

Los ITINs entran en la célula por difusión pasiva o por difusión facilitada (Na (+)-nucleósido). El transporte activo es importante debido a la hidrofilia de los ITINs y a la permeabilidad limitada celular. Múltiples miembros de la superfamilia de transportadores de solutos, formada por más de 350 transportadores ^[Hediger], pueden transportar los ITINs.

Una vez en el interior de la célula, la distribución y proporción de metabolitos fosforilados es controlada por el equilibrio entre los enzimas de fosforilación y los de defosforilación. Los ITINs pueden ser considerados pro-fármacos ya que necesitan previamente ser convertidos en nucleótidos 5-trifosfato, para lo que necesitan el empleo de los enzimas celulares. Al carecer de grupo 3' hidroxilo en su fracción del azúcar, su utilización por parte de la TI finaliza la síntesis del ADN ^[Balzarini 1998]. El primer paso de fosforilación, a menudo limitante, suele ser catalizado por las cuatro deoxinucleosido kinasas implicadas en la vía de recuperación de nucleósidos endógenos, que son: deoxicitidina kinasa del citosol, timidin kinasa 1 (TK1), deoxiguanosina kinasa mitocondrial y timidin

kinasa 2 (TK2) ^[Balzarini 1987]. Muchas de las enzimas implicadas en las vías de recuperación de los deoxinucleosidotrifosfato (dNTPs) permanecen activas durante todo el ciclo celular, probablemente a consecuencia de un requerimiento constante de suministro de dNTPs necesario para la reparación del ADN y para la replicación del ADN mitocondrial. Sin embargo la TK1 se expresa específicamente durante la fase S del ciclo celular. Dado que tanto el AZT como el d4T dependen de la TK1 para su activación, el efecto de estos dos fármacos es menor en células en reposo ^(Gao 1993).

Además de la defosforilación, algunos ITINs, como por ejemplo AZT, ddl, d4T y ABV, son metabolizados y se excretan en forma de sus metabolitos fundamentalmente. El AZT además, sufre la acción no específica del citocromo P450 y de sus reductasas, formándose un metabolito que contiene un grupo amino en su extremo 3' ^[Cihlar]. Por su parte, el ddl y el d4T además de interactuar con los enzimas del metabolismo de los nucleósidos y nucleótidos (para la formación de sus metabolitos trifosfato activos), también son catabolizados por los enzimas de las vías de degradación celulares ^[Cihlar].

Después de la fosforilación a sus respectivas formas trifosfato, los ITINs compiten con los nucleótidos endógenos para la formación del ADN viral por parte de la TI.

Una característica importante de los ITINs es que son activos frente la TI del VIH-1 pero también frente la TI de otros retrovirus como el VIH-2, el virus de inmunodeficiencia del simio... ^[Balzarini 1998, 1996].

Los efectos secundarios asociados a los ITIN son: síndrome de hipersensibilidad (relacionado con el ABC), rash, efectos gastrointestinales (como flatulencia, náusea, diarrea...), astenia, mialgia, insuficiencia renal aguda y síndrome de Fanconi, dislipemia y síndrome de lipodistrofia, pancreatitis, acidosis láctica, neuropatía periférica.

i) Vía metabólica de las pirimidinas

Los nucleósidos están formados por la unión de una base nitrogenada y una pentosa. Si se une un grupo fosfato, obtenemos los nucleótidos, que son los componentes moleculares básicos del ADN y del ARN. Los nucleótidos pueden ser análogos de las purinas (adenina y guanina) o de las pirimidinas (timina, uracilo y citosina).

Prácticamente todos los organismos pueden sintetizar *de novo* los nucleótidos de purina y pirimidina en cantidades suficientes para satisfacer sus necesidades a partir del nitrógeno de algunos aminoácidos y de la ribosa - 5-fosfato. Sin embargo, también es posible la síntesis a partir de los nucleósidos o las bases nitrogenadas obtenidas por la degradación de los ácidos nucleicos en el aparato digestivo, es la denominada síntesis de rescate.

La síntesis *de novo* tiene lugar en 6 pasos (figura 5), con una compartimentalización celular de pasos específicos en el citosol o la mitocondria, permitiendo cambios en la tasa metabólica según necesidad. En la síntesis de las purinas, el material de partida es una forma activada de la ribosa- 5-fosfato, sobre el que se va a formar paso a paso, un anillo purínico, lo que conduce directamente a la producción de un nucleótido. Sin embargo, la síntesis de las pirimidinas es más sencilla ya que primero se ensambla un anillo simple de pirimidina y después se une a una ribosa fosfato para formar uridinmonofosfato (UMP). Los enzimas que catalizan la síntesis de UMP son: el CAD formado por Carbamoylfosfato sintetasa II (CPS II), Aspartato transcarbamoylase (ATCasa) y la Dihidroorotasa (DHOasa), la dihidrooroato deshidrogenasa (DHODH) y la uridinamonofosfato sintasa (UMPS). La presencia del enzima DHODH en la superficie externa de la membrana interna mitocondrial y la conexión funcional a la vía de la ubiquinona de la cadena respiratoria, aseguran suficiente aporte energético y convierten a la vía de síntesis de las pirimidinas en un marcapasos para el crecimiento celular^[Löffler].

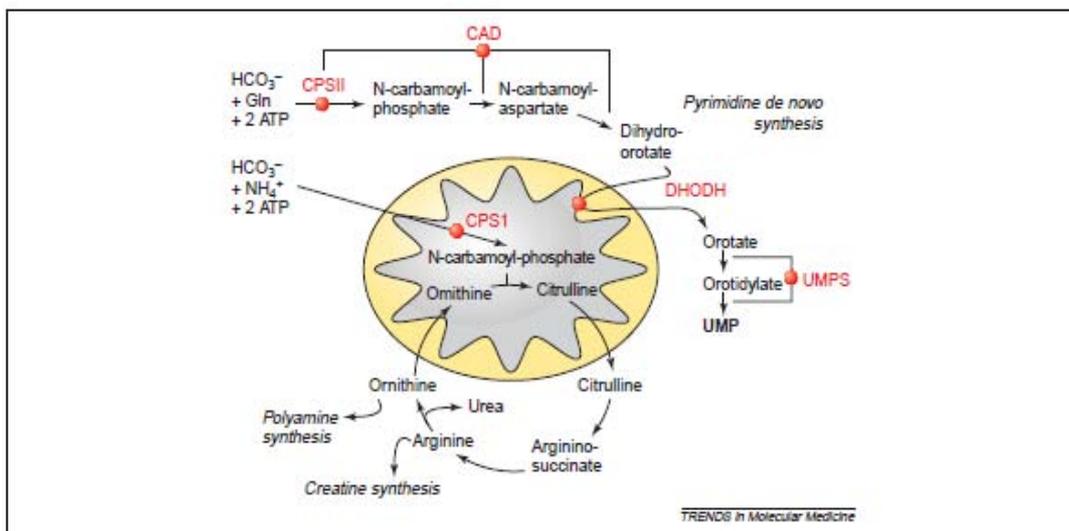


Figura 5. Síntesis *de novo* de las pirimidinas y ciclo de la urea
 TRENDS in Molecular Medicine Vol. 11 No.9 Septiembre 2005 Pág. 431

El UMP es el nucleótido pilar desde el que se forman los nucleótidos de uridina di- y tri-fosfato mediante las kinasas dependientes de adenosintrifosfato (ATP). La citosina trifosfato (CTP) sintasa

cataliza la formación de CTP desde UTP, usando el grupo amida de la glutamina en una reacción dependiente de ATP y guanosintrifosfato (GTP) ^[Simmonds]. La uridina y la desoxiuridina difosfato se forman de la citidina o la desoxicitidina por la citidina deaminasa. La deoxiuridina difosfato (dUMP) es defosforilada para producir deoxiuridina monofosfato (dUMP) y ser convertida mediante la timidilato sintasa (TS) a deoxitimidina monofosfato (dTMP) usando ácido (N5, N10-) metilendetrahidrofolico ^[Löffler]. La conversión de ribonucleótidos difosfato a deoxiribonucleótidos difosfato es catalizada por la ribonucleótido reductasa tanto para nucleótidos de pirimidina como de purina ^[Chabes]. La cantidad de deoxitimidina sólo aumenta notablemente durante la replicación del ADN. La defosforilación de los deoxinucleótidos monofosfato de pirimidina a sus correspondientes nucleósidos es catalizada por las 5' – nucleotidasas, lo cual constituye un requisito necesario para su liberación a la circulación.

Existe también una vía de rescate de nucleótidos mediante las Timidilato quinasas (TK) 1 y 2 que reciclan la deoxitimidina de la renovación celular y de la dieta. La TK1 es sintetizada en el citoplasma durante la fase S de la división celular y posteriormente es degradada intracelularmente. La TK2 se localiza en la mitocondria y su síntesis también depende del ciclo celular. Ambas quinasas son inhibidas por la timidina trifosfato (TTP), que es producto de la fosforilación de la timidina. Esto permite mantener una cantidad de TTP disponible para la síntesis de ácidos nucleicos sin saturar el sistema.

La importancia de mantener la vía de las pirimidinas intacta radica en su primordial papel en la regulación del crecimiento celular (alterado en los procesos malignos), lo cual las convierte en una diana ideal para la intervención farmacológica. La inhibición de una reacción enzimática concreta origina el acumulo de los metabolitos intermedios previos a la misma y una carencia de los metabolitos posteriores. El consiguiente desequilibrio de desoxinucleótidos puede dar lugar a errores de codificación genética y la desaparición completa de uno de ellos, se puede traducir en la detención de la síntesis de ADN.

Varios enzimas del metabolismo de las pirimidinas han sido empleados como dianas para el desarrollo de diversos fármacos. Así por ejemplo, de entre los inhibidores de la DHODH, la atovacuona ha demostrado su eficacia en el tratamiento de infecciones oportunistas y de la malaria ^[Hudson] mientras que la leflunomida ha sido empleada como fármaco inmunomodulador en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide ^[Rückemann]. Inhibidores de la TS como el 5-fluoruracilo y el metotrexate han sido empleados con éxito en el tratamiento del cáncer ^[Jackman].

En la infección por el VIH, los primeros que demostraron su utilidad fueron los inhibidores de la UMPS (6-azauracil, pirazofurina) y los inhibidores de la ribonucleótido reductasa (p. ej. hidroxiurea) [Christopherson]. En el caso de los inhibidores de la UMPS, los fármacos eran capaces de inhibir la síntesis *de novo* de las pirimidinas, paso esencial en la replicación del VIH, del *Plasmodium falciparum* o del *Toxoplasma gondii*, sin embargo, su uso estaba limitado por su toxicidad [Christopherson].

c) Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (ITINNs)

Los primeros ITINNs en ser identificados fueron el 1-(2-hidroxietoximetil)-6-(feniltio)timina (HEPT) en 1989 [Miyasaka] y el tetrahidroimidazol[4,5,1-jk][1,4]benzodiazepin-2(1H)-uno (TIBO, siglas en inglés). La unión de los ITINNs a la TI en un bolsillo hidrofóbico localizado en el dominio catalítico induce un cambio conformacional que influye en la propia actividad catalítica del enzima [Sluis-Cremer]. A diferencia de los ITINs, los ITINNs no necesitan ser metabolizados para ejercer su acción sobre la TI y son inhibidores específicos de la TI del VIH-1 y no son activos frente a otros retrovirus [Balzarini and De Clercq, 1996, 1998]. Curiosamente, a pesar de la heterogeneidad en términos de estructura molecular, todos los ITINNs se unen a la misma región de la TI (localizada en el dominio de la palma de la subunidad p66 a una distancia aproximada de la región catalítica del enzima de 10 Å).

El primer ITINN aprobado por la FDA fue la nevirapina (NVP) en 1996, seguido de la delavirdina en 1997 y del efavirenz (EFV) en 1998. La etravirina (ETV) es un ITINN de segunda generación aprobado en 2008 por la FDA para el uso en pacientes con infección por VIH-1 resistente a los ITINNs de primera generación.

Además del cambio conformacional de la TI, recientemente se ha descubierto que los ITINNs pueden interferir en distintos pasos de la transcripción inversa mediante la inhibición o el estímulo de la ARNasa H. Este efecto depende de la plantilla y del inhibidor empleado. Así por ejemplo la NVP y el EFV aumentan la heterodimerización de la TI mientras que la delavirdina no, aunque no parece que este efecto interfiera en la inhibición de la transcripción inversa.

Existen datos estructurales y de los experimentos cinéticos previos que muestran que los ITINNs no inhiben directamente la formación del enlace fosfodiéster, sino que evitan el posicionamiento correcto de los dNTP en relación con el primer/ molde terminal. Este es un mecanismo adicional por

el que los ITINNs inhiben la TI ^[Apostolova]. El aumento de la afinidad en la unión de la TI por los dNTs y también por las formas trifosfato de los ITINs en presencia de los ITINNs, podría explicar la fuerte sinergia y la eficacia de estas dos clases de fármacos cuando se administran juntas (generalmente como tratamiento de primera línea en pacientes naïve, es decir, no tratados previamente).

Los efectos secundarios más frecuentes de los ITINNs son síndrome de hipersensibilidad, rash (incluyendo síndrome de Stevens-Johnson y necrosis epidérmica tóxica), elevación de los enzimas hepáticos, hiperlipidemia y efectos sobre SNC (sueños vívidos, mareo, sensación de abotargamiento, relacionados sobre todo con el uso de EFV).

d) Inhibidores de la proteasa

La proteasa viral es fundamental para la generación de partículas virales infectivas. El conocimiento de la estructura y del funcionamiento del enzima ha permitido el desarrollo de fármacos inhibidores de la proteasa (IPs).

El primer IP aprobado por la FDA fue el Saquinavir en 1995, formulado inicialmente como una cápsula que se toleraba bien pero que no conseguía una reducción de la carga viral (CV) mantenida ^[Noble]. Aproximadamente un 50% de los pacientes que recibían SQV en monoterapia presentaban al año CV elevadas con virus con sensibilidad disminuida a SQV, principalmente debido al desarrollo de mutaciones 48V y/o 90M en el gen que codifica la proteasa viral ^[Jacobsen].

La introducción de los IPs en el tratamiento antirretroviral, facilitando la terapia triple (dos ITIN más un IP), se denominó Tratamiento Anti-Retroviral de Gran Actividad (TARGA) y marcó un antes y un después en la vida de los pacientes infectados por el VIH-1.

Sin embargo, el uso de los IPs estuvo limitado inicialmente por el desarrollo de mutaciones que conferían resistencia a toda la familia de los IPs cuando se administraban en monoterapia, el elevado número de comprimidos con estrictas recomendaciones de ingesta debido a su baja biodisponibilidad y los efectos secundarios de los IPs de primera generación (toxicidad renal del IDV, severos efectos gastrointestinales, parestesias, elevación de las transaminasas y de los lípidos por parte del ritonavir).

Para prevenir la selección de resistencias se llevaron a cabo dos estrategias, una consistió en añadir a los IPs dosis bajas de ritonavir como potenciador ya que es un inhibidor del citocromo p450 y facilita que los niveles de en plasma sean mayores por lo que el virus tiene que adquirir muchas más mutaciones en la secuencia de la proteasa para alcanzar resistencia clínica. La segunda estrategia fue el desarrollo de IPs de segunda generación como el darunavir (DRV) con una alta barrera genética para el desarrollo de mutaciones.

Los IPs de primera generación son el saquinavir (SQV), el indinavir (IDV), el nelfinavir (NFV) y el ritonavir (RTV). La segunda generación de IPs la conforman el amprenavir (APV) y su profármaco el fosamprenavir (FAPV), el lopinavir (LPV), el atazanavir (ATV), el tripanavir (TPV) y el darunavir (DRV).

Todos los IPs a excepción del tripanavir son inhibidores competitivos peptidomiméticos, que imitan la forma del sustrato natural de la proteasa. Los peptidomiméticos contienen un núcleo formado por hidroxietileno que evita la escisión del IP por parte de la proteasa ^[Kempf// Craig]. El TPV contiene un anillo de dihidropirona como armadura central y es menos potente que los IPs peptidomiméticos ^[Turner].

Entre los efectos secundarios de los IPs destacan las alteraciones metabólicas (incluyendo dislipemia, hiperglicemia, resistencia a la insulina y lipodistrofia), hiperbilirrubinemia (ATZ), nefrolitiasis y dolor lumbar (IDV), entre otros.

6. Toxicidad mitocondrial y su implicación en los efectos secundarios asociados al tratamiento antirretroviral basado en ITINs análogos de las pirimidinas

A pesar de su efectividad frente al VIH-1, los ITINs presentan una serie de efectos secundarios a largo plazo que limitan su uso. Algunos de ellos son muy graves y potencialmente mortales como por ejemplo la acidosis láctica o la pancreatitis asociada al uso de d4T y ddI ^[Bissuel // John // Moore 2001]. Otros, sin embargo, pueden conllevar la incapacidad parcial o permanente del paciente para llevar una vida activa normal, como es el caso de la neuropatía periférica grave.

Poco tiempo después de la introducción de la zidovudina en 1987 se pudo observar la presencia de miopatía esquelética en pacientes que recibían dicho fármacos. El análisis de biopsias de músculo esquelético demostró la presencia de fibras musculares rojas rasgadas y un contenido de ADN mitocondrial (ADNmt) menor, así como cambios morfológicos en las mitocondrias ^[Arnaudo].

Por otra parte, diversos estudios relacionaron cambios mitocondriales en pacientes VIH-1 con la aparición de neuropatía periférica, resistencia a la insulina e hiperlactatemia y acidosis láctica ^[Dalakas // Lo].

En 1999 se postuló por primera vez que la toxicidad mitocondrial asociada a los ITINs podría ser la causa del síndrome de lipodistrofia asociado al tratamiento antirretroviral y a la infección por VIH-1 (HALS, siglas en inglés).

a) Concepto de toxicidad mitocondrial

La mitocondria es una organela intracelular localizada en el citoplasma, descubierta en 1890 y cuya función principal es la de suministrar la energía necesaria a la célula. Está compuesta por dos membranas que separan el citoplasma, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. Es en esta matriz donde se encuentran las copias de ADN mitocondrial (ADNmt), heredado de manera casi exclusiva por vía materna y cuyo genoma (compuesto por unas 16569 pares de bases, pb) fue totalmente secuenciado en 1981.

Todas las células contienen mitocondrias excepto los eritrocitos. Una sola célula puede contener entre cientos y miles de mitocondrias y cada una de ellas contiene entre 2 y 10 copias de

ADNmt^[Maagaard]. Al carecer de enzimas reparadores de ADN, las mitocondrias son más susceptibles a las mutaciones^[Graziewicz] y de hecho la tasa de mutaciones del ADNmt es 10 veces mayor que la tasa de mutaciones del ADN nuclear^[Wallace].

El ADNmt codifica las subunidades de 4 de los 5 complejos del sistema de fosforilación oxidativa, responsable último de la obtención de la energía. Sin embargo las mitocondrias también participan en la apoptosis, en la oxidación de los ácidos grasos libres y en la homeostasis del calcio.

La toxicidad mitocondrial de los ITINs está basada en su capacidad de inhibir a la polimerasa α mitocondrial (Pol- α). Los nucleótidos trifosfato no son únicamente sustratos de la TI, sino que también pueden ser empleados por la Pol- α para replicar el ADN mitocondrial, produciendo la terminación de la cadena de replicación al carecer de grupo hidroxilo 3'. Además de la finalización de la síntesis, producen igualmente una inhibición competitiva de la Pol- α , ya que compiten con los nucleótidos naturales para ser incorporados en la cadena de ADNmt. También inducen la aparición de errores durante la replicación ya que inhiben la función de lectura de prueba de la Pol- α exonucleolítica y reducen la actividad exonucleasa reparadora de ADN al no poder ser retirados los nucleótidos trifosfato^[Lewis 2006].

El ADNmt codifica 13 proteínas esenciales de la cadena respiratoria mitocondrial, por tanto no importa el mecanismo último por el que la replicación de ADNmt esté comprometida ya que el resultado final es la interferencia con la correcta síntesis de la cadena transportadora de electrones mitocondrial^[Lewis 2003] (fig 6). La hipótesis de la Pol- α postula que el tratamiento con ITINs interrumpe la formación de energía producida por la fosforilación oxidativa, dando lugar a alteraciones en la función de la mitocondria, como puede ser la liberación de radicales libres de oxígeno.

Algunas de las manifestaciones de los efectos secundarios a largo plazo de los ITINs muestran semejanzas con la expresión fenotípica de las enfermedades mitocondriales hereditarias^[Brinkman]. Cambios mitocondriales similares a los observados en la miopatía asociada a la zidovudina (depleción de ADNmt y rotura de fibras rojas) han sido observados posteriormente en la cardiomiopatía, neuropatía periférica, resistencia a la insulina y diabetes, síndrome de lipodistrofia, hiperlactatemia así como acidosis láctica, esteatosis hepática y pancreatitis^[Fleischman //Olano].

La acidosis láctica constituye un efecto secundario de los ITINs potencialmente mortal. Aunque se considera un efecto poco común con una incidencia aproximada de 1 por 1000 pacientes/año [Imhof], se ha publicado recientemente una incidencia de 16.1 casos por 1000 pacientes/año en mujeres. Esto podría ser debido a que las concentraciones intracelulares de zidovudina y lamivudina trifosfatos son mayores en mujeres (sin que exista una concentración plasmática de estas mismas drogas más elevada). Aunque se ha descrito disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial en pacientes tratados con ITINs con hiperlactatemia sintomática [Côté], el lactato plasmático no es un marcador fiable de toxicidad mitocondrial.

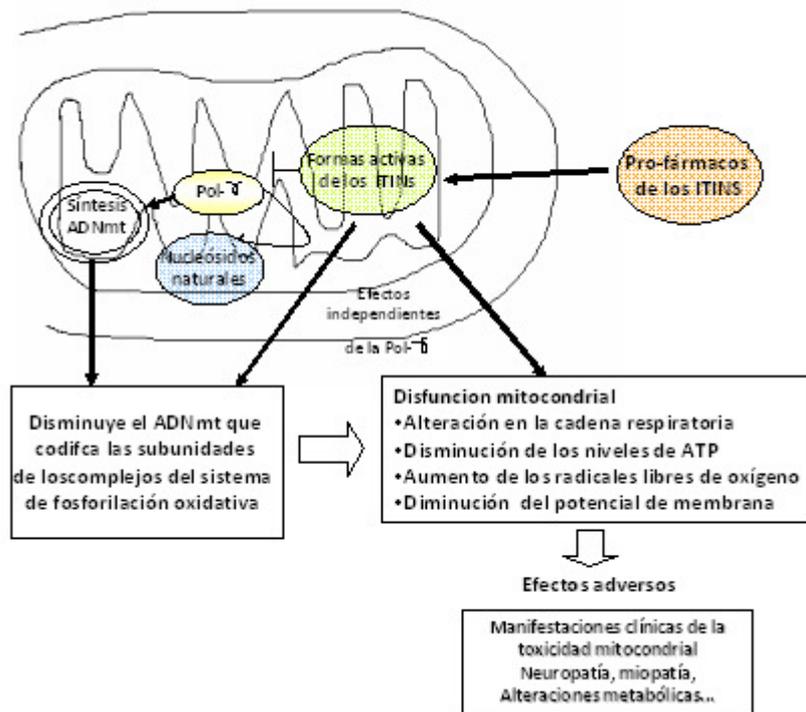


Figura 6. Adaptación de "Schematic representation of the mitotoxic effect induced by N(t)RTI according to the "Pol- γ hypothesis".

Apostolova N et al. Mitochondrial toxicity in HAART: An overview of *in vitro* evidence.

Curr Pharm Des. 2011;17(20):2130-44.

Sin embargo, no todos los efectos secundarios de los ITINs se deben exclusivamente a la inhibición de la Pol- γ , existen otros mecanismos de afectación mitocondrial. Así por ejemplo, Lund y Wallace demostraron que varios ITINs podían inhibir la respiración mitocondrial, alterar el potencial de membrana y la homeostasis del calcio en miocitos [Lund 2004]. Posteriormente los mismos autores publicaron datos sobre la alteración del Complejo I mitocondrial por parte de la zidovudina y de la didanosina en células HepG2 que ocurre a través de la fosforilación dependiente de cAMP de este complejo [Lund 2008].

Se ha demostrado que la zidovudina induce diferentes alteraciones mitocondriales incluyendo efectos directos sobre mitocondrias aisladas. Estas alteraciones incluyen mecanismos como la inhibición de la fosforilación de timidina ^[Lynx], niveles disminuidos del citocromo oxidasa c (complejo IV), alteraciones en la respiración unida a NADH, inhibición de la adenilato quinasa y un aumento del estrés oxidativo ^[Apostolova]. En otros estudios *in vitro*, la zidovudina induce una ruptura de la ultraestructura mitocondrial y la expresión del ARNm del citocromo b ^[Cazzalini]. La estavudina a su vez puede alterar la oxidación de los ácidos grasos sin producir una depleción del ADNmt en hepatocitos de rata cultivados ^[Igoudjil].

La toxicidad mitocondrial depende de varios factores. Los niveles de toxicidad dependen de la abundancia intracelular de los ITINs ya que una vez sobrepasado cierto umbral éstos compiten con los nucleótidos naturales ^[Lewis 2006// Lee 2003]. Además la toxicidad puede depender de la habilidad de la quinasa celular para fosforilar los nucleósidos análogos y producir las formas -TP. El tipo de tejido también influye, ya que no todos los tejidos son igual de dependientes de la fosforilación oxidativa ^[Apostolova]. El número de copias de ADNmt debe caer entre un 20 y un 40% por debajo de los niveles basales para inducir alteración de la función mitocondrial. Por último, aunque no menos importante, también existe un factor relacionado con la propia susceptibilidad del individuo a presentar toxicidad mitocondrial. En 2007 Yamanaka y cols describieron la primera mutación de la Pol- γ (mutación R964C) unida a toxicidad mitocondrial mediada por d4T ^[Yamanaka]. Esta polimerasa mutada presentaba una capacidad de discriminación entre los nucleótidos naturales y el d4T-TP tres veces menor, lo que conllevaba una toxicidad mitocondrial mediada por d4T aumentada ^[Bailey].

Recientemente se ha descubierto una asociación entre el polimorfismo E1143G de la Pol- γ y un aumento de la prevalencia de lipodistrofia en pacientes tratados con d4T, sin embargo se desconoce el efecto de esta mutación *per se* sobre la toxicidad mitocondrial del d4T ^[Chiappini].

b) Síndrome de lipodistrofia y alteraciones lipídicas.

Es bien conocida desde hace tiempo la relación que existe entre la infección por el VIH, el TARGA y los trastornos metabólicos como son la dislipidemia, el aumento de resistencia a la insulina y la redistribución del tejido adiposo ^[Estrada]. La combinación de estos trastornos se asemeja al llamado “síndrome metabólico” que se asocia con un mayor riesgo cardiovascular y con el desarrollo de diabetes ^[Expert panel 2001, JAMA].

Uno de los principales problemas a la hora de establecer la prevalencia de la lipodistrofia es la ausencia de criterios diagnósticos unificados para describir las alteraciones de la distribución grasa, ya que en la población general se emplean patrones basados en la edad, el peso y el sexo, pero éstos no están bien definidos [Schwenk // Carr et al 2003]. Por otra parte, un estudio reciente ha demostrado que cuando la lipoatrofia se detecta en la exploración clínica, ya se ha perdido al menos el 30% de la grasa [Podzamczar]. Sin embargo muchos estudios están realizados sobre la asunción arbitraria de una pérdida del 10-20%, lo que conlleva aun mayor dificultad para poder comparar prevalencias. Es por esto, que las cifras de prevalencia varían entre un 18 y un 83% y un 50% si se tiene en cuenta al menos una alteración (por ejemplo, pérdida de grasa periférica o aumento de grasa visceral o pérdida de grasa en general) [Carr 2003].

El término “síndrome de lipodistrofia asociado a la infección por VIH y al TARGA” (HALS) fue introducido por primera vez por Carr et al en 1998 para describir una nueva condición médica compleja que incluía una redistribución anormal de la grasa corporal y alteraciones metabólicas en pacientes que recibían TARGA basado en IPs [Carr 1998].

Los factores de riesgo que se han asociado al desarrollo de HALS son la duración de la exposición al fármaco, estado de inmunosupresión, edad avanzada, sexo masculino, bajo nivel de grasa previo al inicio del TARGA y recibir tratamiento con “d-fármacos” (ddI, ddC y d4T), siendo el d4T el más fuertemente relacionado [Saint-Marc// Carr 2000 //Mallal // Galli].

El signo clínico más relevante es una pérdida de la grasa subcutánea (lipoatrofia) en la cara (regiones periorbital y temporal), extremidades y nalgas. La pérdida de grasa periférica se puede acompañar de un depósito de grasa visceral que puede ocasionar síntomas gastrointestinales leves. La acumulación de grasa también puede localizarse en la región dorsocervical en forma de almohadillas grasas como la “giba de búfalo”, en el músculo y en el hígado.

A pesar de que desde su descripción inicial han sido múltiples los estudios desarrollados y las hipótesis empleadas para explicar su etiología, ésta aún no está del todo establecida. Así, por ejemplo tanto los IPs como los ITINs han sido asociados en diversos estudios con el desarrollo de la redistribución de la grasa corporal, tanto a nivel clínico [Carr AIDS 2000// Mallal AS AIDS 2000] como *in vitro* [Ranganathan// Walker], siendo la combinación de d4T y ddI particularmente dañina [Berhems 2006]. La hipótesis más aceptada se basa en la toxicidad mitocondrial inducida por los ITINs [Moyle // Anderson], a través de la

reducción de la producción energética por el aumento de la apoptosis celular y de la disminución de la diferenciación de los adipocitos ^[Apostolova]. El AZT y el d4T producen un aumento del estrés oxidativo que conlleva una reducción de adiponectina y leptina y un aumento en paralelo de la producción de proteína quimio atrayente de monocitos tipo 1 (MCP-1, siglas en ingles) y de IL-6 ^[Lagathu]. Por su parte algunos IPs, por ejemplo nelfinavir o lopinavir, son capaces de inhibir la diferenciación de los pre-adipocitos a adipocitos mediante el aumento de especies reactivas de oxígeno que inducen un aumento de liberación de IL-1 β y TFN- α ^[Lagathu].

Otras teorías propuestas se basan en el propio virus ^[Bacchetti], el síndrome de reconstitución inmune o un estado de inflamación crónica ^[Grunfeld]. Las proteínas accesorias Vpr y Nef han sido relacionadas con el desarrollo de resistencia a la insulina, cambios en la síntesis y almacenamiento del colesterol y con alteraciones de la adipogénesis ^[Kino] (figura 7).

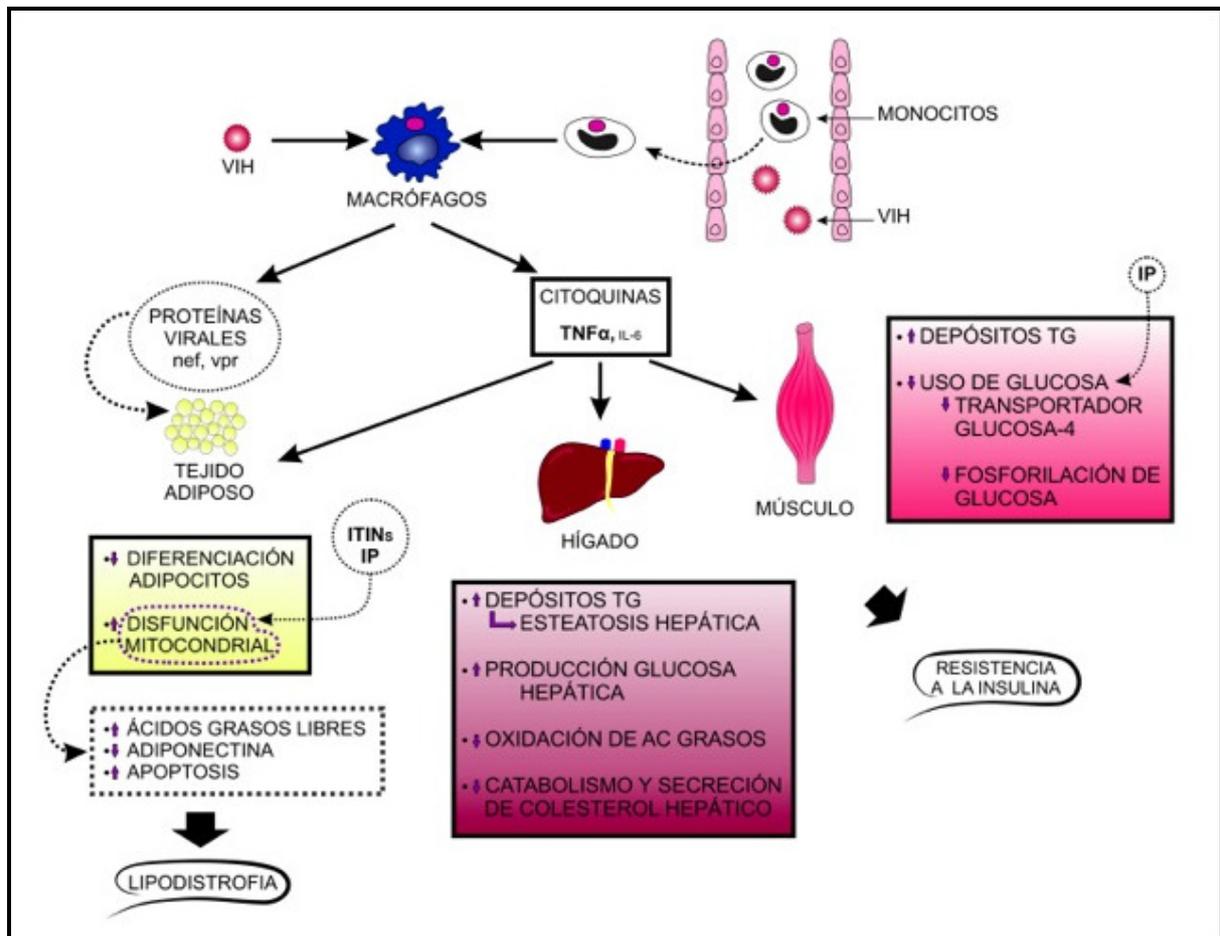


Figura 7. Relación entre el síndrome de lipodistrofia asociado a la infección por el VIH con la inflamación crónica, el propio virus y los diferentes tejidos implicados en el síndrome metabólico.

El TNF- α (factor de necrosis tumoral α) es un mediador químico con propiedades pro-inflamatorias que ejerce un papel fundamental en la inmunidad innata y adaptativa, la proliferación celular y la apoptosis y que es producido por diferentes tipos celulares (macrófagos, monocitos, adipocitos, células musculares lisas...) En el caso de la infección por el VIH-1, se ha relacionado niveles elevados de dicha citoquina con el desarrollo del síndrome metabólico asociado al VIH y al TARGA ^[Popa]. Se ha asociado el polimorfismo -238A en la región promotora del gen del TNF- α con el desarrollo de lipodistrofia ^[Maher]. Si bien, un meta-análisis posterior no ha podido demostrar esa relación ^[Velo].

Sin embargo, dado que no todos los pacientes con infección por el VIH-1 con una historia farmacológica similar desarrollan HALS, y que existen distintos grados de afección, es lógico pensar que existen además factores intrínsecos al propio paciente que favorecen una cierta susceptibilidad personal, entre ellos los factores genéticos.

Desde el punto de vista de las alteraciones del metabolismo lipídico, existe una evolución en el perfil lipídico de los pacientes. Así, en etapas iniciales de la infección podemos encontrar una leve disminución del HDL-c (colesterol HDL) ^[Zangerle], seguido de un aumento de partículas LDL-c (colesterol LDL) pequeñas y densas (muy aterogénicas) y de apo B ^[Badiou]. Mientras que en estadios avanzados, encontramos un aumento de la concentración plasmática de TG (Triglicéridos) ^[Wierzbicki].

El propio virus contribuye a las alteraciones del metabolismo lipídico. Por una parte, aunque no son sus células diana más comunes, el VIH puede infectar los adipocitos produciendo una alteración de la diferenciación de los adipocitos a través de sus proteínas accesorias Nef y Vpr. La liberación en el tejido adiposo de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α o INF- α producen un aumento de la concentración plasmática de TG mediante la interferencia en el metabolismo de los ácidos grasos libres (AGL) y la oxidación lipídica. Además, el VIH disminuye los niveles plasmáticos de HDL-c lesionando el flujo del transportador de colesterol de los macrófagos en el llamado "transporte reverso de colesterol" de los tejidos hacia el hígado para su metabolismo y excreción ^[Oh].

Una vez iniciado el TARGA, el perfil lipídico de los pacientes varía, y lo hace de manera diferente según el régimen que reciban. Así, los IPs se asocian a un aumento de los TG, del colesterol total (CT) y de LDL-c. A pesar de que la dislipemia es un efecto secundario asociado al grupo farmacológico, no todos los IPs producen el mismo efecto. Ritonavir (RTV), es un inhibidor de la proteasa potente inhibidor también del enzima hepático citocromo P4503A4 empleado como potenciador de otros IPs, aumentando la vida media y permitiendo disminuir el número de pastillas de los mismos. Un

estudio realizado en voluntarios sanos demostró que el ritonavir empleado incluso a dosis de potenciador (100 mg cada 12 h), aumentar los TG alrededor de un 26% y el LDL-c un 16% tan solo 2 semanas después de iniciar el tratamiento ^[Shafran]. Cuando el ritonavir se combina con otros IPs como lopinavir, incluso en sujetos VIH negativos, el incremento en los TG plasmáticos alcanza un 83%, en los AGL un 30% y el VLDL-c aumenta en un 33% a las 4 semanas de tratamiento ^[Lee 2004]. Atazanavir y darunavir son dos IPs con un mejor perfil lipídico ^[Mills].

Entre los ITINs, el d4T y el AZT se han asociado con un peor perfil lipídico, con un aumento significativamente mayor del CT, LDL-c y TG que otros ITINS, por ejemplo el tenofovir ^[Gallant]. Mientras que entre los ITINs más empleados, EFV y NVP, el EFV ha demostrado mayores incrementos en los TG plasmáticos (49%) que NVP ^[van Leth].

La dislipidemia asociada al TARGA podría implicar también una cierta predisposición genética, ya que no todos los pacientes que toman TARGA tienen alteraciones metabólicas comparables. Por ejemplo, los polimorfismos llamados 482C>T y 455T>C en los genes que codifican para la apoproteína APOC3 han sido asociados con concentraciones plasmáticas elevadas de TG y concentraciones disminuidas de HDL en pacientes VIH-1 ^[Fauvel]. El polimorfismo 113T>C de los genes que codifican para la APOA5 se ha asociado con hipertrigliceridemia en pacientes tratados con regímenes basados en IP ^[Guardiola].

c) Resistencia a la insulina

En el síndrome metabólico que acompaña a la infección por VIH-1 y al TARGA destacan por su frecuencia las alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Son múltiples las teorías que explican la resistencia a la insulina de los pacientes VIH y no pueden separarse de las hipótesis sobre la redistribución grasa o las alteraciones lipídicas, ya que comparten los mismos mecanismos fisiopatológicos. Además de los efectos deletéreos del tratamiento antirretroviral, se han asociado una susceptibilidad genética subyacente, la edad, influencias ambientales y múltiples factores relacionados con la enfermedad ^[Butt].

La resistencia a la insulina es la suma de los efectos del TARGA, de la inflamación crónica, de la edad y de la propia lipodistrofia (figura 8). Así, el TARGA ejerce su efecto mediante la toxicidad mitocondrial de los ITINs y la alteración del transportador de glucosa-4 (GLUT4). Los IPs de primera generación como el saquinavir o el indinavir, han demostrado bloquear la captación de glucosa

estimulada por la insulina de manera directa a través de la inhibición directa del GLUT4. Esta inhibición es no competitiva y reversible ^[Hruz].

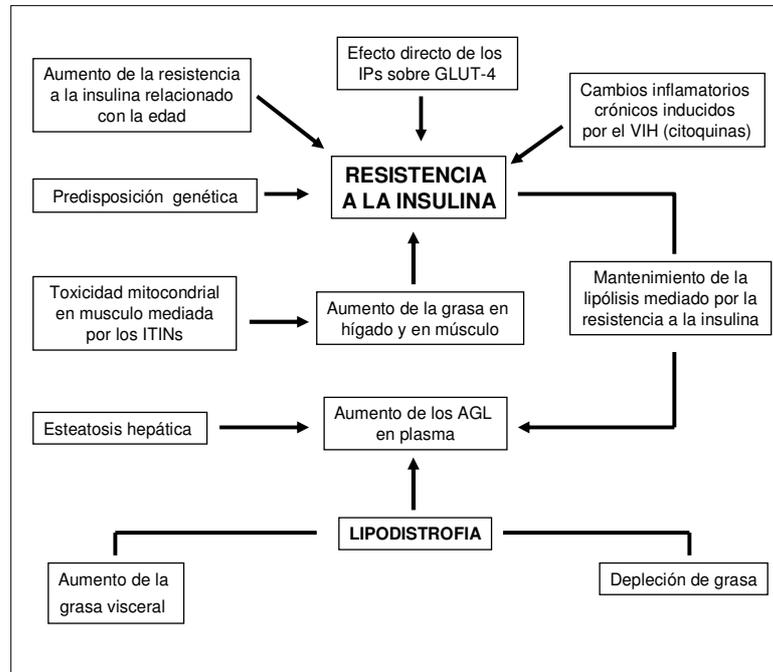


Figura 8 . Causas de la resistencia a la insulina relacionada con la infección por VIH.

Adaptación de: Shikuma CM, Day LJ, Gerschenson M. Insulin resistance in the HIV-infected population: The potential role of mitochondrial dysfunction. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2005;5(3):255-62.

Los IPs que inhiben el transporte de la glucosa en la grasa también alteran la disposición de la glucosa en el músculo. Se ha relacionado el TARGA con la absorción deteriorada de la glucosa en el músculo esquelético en pacientes VIH-1 positivos mediante el uso del test “gold standard” para la evaluación directa de la utilización periférica de la glucosa en estudios fármaco-dinámicos en diabetes, la pinza hiperinsulinémica euglucémica, ^[Behrens 2002].

Existen cambios inflamatorios en el tejido adiposo, como la presencia de macrófagos que secretan citoquinas como el TNF- α y la IL-6 (interleuquina-6). Ambas se encuentran elevadas y son probablemente mediadores de la resistencia a la insulina en la infección por el VIH-1 ^[Hruz]. Sin embargo, el estado de inflamación crónica mediada por el TNF- α y otras citoquinas como la IL-6, actúa directamente sobre hígado y el músculo también, aumentando los depósitos de TG en ambos tejidos, aumentando la producción de glucosa hepática y disminuyendo el uso de la misma en el músculo.

El tejido adiposo juega un papel importante, no solo como depósito de almacenamiento de energía, sino también porque actúa como el mayor tejido endocrino del cuerpo ^[Galic], y puede alterar la expresión y localización de las proteínas de unión al elemento regulador de los esteroides tipo I (siglas en inglés, SREBP-1), que influye en la expresión de factores adipogénicos. La hipótesis es que las limitaciones en la capacidad de almacenamiento de los triglicéridos en el tejido adiposo pueden dar lugar a un acumulo anormal de grasa en los tejidos que responden a la insulina como el hígado y el tejido músculo-esquelético, con la consecuente interferencia en la señalización normal de la insulina ^[Jones].

Se ha descubierto además la existencia de adipocitoquinas como la adiponectina, la leptina y la resistina. Los pacientes VIH-1 positivos tratados con TARGA presentan un patrón de adipocitoquinas similar a personas con síndrome metabólico no relacionado con el VIH como una disminución en la adiponectina y un aumento en la leptina. Tanto los IPs como los ITINs se han relacionado con bajos niveles de adiponectina ^[Lagathu // Jones].

El tratamiento con AZT/3TC ha sido relacionado con resistencia a la insulina independientemente de los cambios en la composición de la grasa corporal, cuando se compara con pacientes con regímenes antirretrovirales libres de ITINs ^[Blümer]. En un estudio en voluntarios sanos, se ha visto que el empleo de d4T durante 4 semanas reduce la función mitocondrial e induce resistencia a la insulina ^[Fleischman].

d) Otros trastornos asociados a la toxicidad mitocondrial

i. Pancreatitis

La pancreatitis aguda es la causa de más de 220000 admisiones hospitalarias anuales en EEUU. El diagnóstico es fundamentalmente clínico basado en las características del dolor abdominal, las náuseas y la presencia de enzimas pancreáticas (lipasa y amilasa) elevadas tres veces por encima de su límite normal ^[Whitcomb]. Desde el comienzo de la pandemia de VIH se ha producido un aumento en la tasa anual en EEUU, llegándose a publicar una tasa de 14 a 17 casos por cada 100 pacientes VIH positivos ^[Dutta]. Sin embargo, un estudio multicéntrico llevado a cabo por los investigadores de la cohorte EuroSIDA entre 2001 y 2006 con más de 9000 pacientes VIH, demostró una tasa global de pancreatitis “baja” con unos 1.27 casos por 100 pacientes-año ^[Mocroft].

Puede ser tanto la presentación inicial del SIDA secundaria por ejemplo a una causa infecciosa (el propio VIH o infecciones oportunistas como CMV, Criptosporidiasis o Micobacterias) como un efecto adverso de la medicación antirretroviral ^[Mocroft]. Los factores de riesgo asociados con la pancreatitis en pacientes VIH son la historia de consumo excesivo de alcohol y la enfermedad biliar (principales factores de riesgo en personas adultas sanas), hipertrigliceridemia, infecciones oportunistas, profilaxis (por ejemplo, pentamidina), el tratamiento antirretroviral con los ITINs (particularmente didanosina y estavudina), o el uso de otras medicaciones como los corticoides, el metronidazol o las sulfonamidas ^[Raza]. El estado de inmunosupresión influye en la presentación de pancreatitis, particularmente con una cifra de CD4 inferior a 50 cels/mm³, tal y como han demostrado varios estudios ^[Reisler //Raza].

El mecanismo por el que ocurre la pancreatitis en los casos relacionados con el TARGA permanece incierto. Se relacionó inicialmente con la esteatosis hepática/acidosis láctica que aparecían en algunos pacientes que recibían zidovudina. Posteriormente se ha descrito en relación con el uso de estavudina. En pacientes VIH-1 que han recibido regímenes antiretrovirales con didanosina, se ha descrito una incidencia de pancreatitis de entre 1-7%.

Se trata de un efecto adverso serio que pone en peligro la vida del paciente. El 20% de los pacientes con una pancreatitis aguda tienen un curso grave y de estos entre el 10 y el 30% muere.

La aparición de pancreatitis aguda obliga a retirar el tratamiento antirretroviral de manera inmediata y en la mayor parte de los casos contraindica la reintroducción de los mismos fármacos.

ii. Neuropatía periférica

La neuropatía periférica es una de las complicaciones neurológicas más frecuente de la infección por VIH-1 ^[Manji]. Se pueden clasificar según el momento de aparición de la clínica (asociadas o no al estadio SIDA), su etiología (causadas por infecciones oportunistas como CMV, toxicidad del TARGA, la propia infección por el VIH-1) y si son axonales o desmielinizantes.

Los cuatro tipos más frecuentes son: las neuropatías sensoriales asociadas a la infección por VIH-1, las polirradiculopatías inflamatorias desmielinizantes (asociadas a fases iniciales de la infección), mononeuropatías múltiples (asociadas con mecanismos vasculíticos en las fases iniciales y a infecciones oportunistas como CMV en fases tardías) y radiculopatía progresiva que aparece asociada a infección por CMV en estadios avanzados de la infección por VIH-1.

El primer grupo lo componen la polineuropatía simétrica distal (DSP, siglas en inglés) y la neuropatía tóxica asociada al TARGA (TNA, siglas en inglés), particularmente asociada a los dideoxynucleótidos de los ITINs (ddI, ddC y d4T) y juntas constituyen la afectación neurológica más frecuente en pacientes con VIH-1/SIDA. El síntoma más común es el dolor, típicamente bilateral, de inicio gradual y descrito como sensación de acorchamiento o disminución de la sensibilidad dolorosa y sensación de quemazón ^[Conrblath]. La afectación es más intensa en las plantas de los pies y empeora por las noches. Frecuentemente los pacientes refieren hiperalgesia y alodinia. En la exploración física podemos encontrar reducción o ausencia de los reflejos aquíleos.

La DSP es una complicación de estadios avanzados de la infección (SIDA). Su incidencia varía de unos estudios a otros desde un 17% en estudios realizados en pacientes ambulatorios con VIH ^[Woolley] hasta un 35% en un estudio transversal de pacientes hospitalizados en San Francisco realizado al inicio de la epidemia ^[So]. La incidencia estimada en la era pre-TARGA en un estudio de cohortes multicéntrico (MACS, multicentric AIDS cohort study) fue del 7% en aquellos con una cifra de CD4 < 200 cels/ mm³. Además de la cifra de CD4, los pacientes con CV > 10000 copias/ml presentaban un riesgo 2.3 veces mayor de desarrollar DSP ^[Childs].

Se caracteriza por la degeneración distal de los axones largos. Este patrón ha recibido el nombre de “degeneración retrógrada” porque comienza en las regiones distales y progresa de manera centrípeta. Existen diversas teorías sobre la etiología de la DSP. Una de ellas postula la existencia de macrófagos “hiperactivos”, que son reclutados en el contexto de cierto grado de degeneración axonal secundaria a deficiencias nutricionales o abuso de alcohol u otras sustancias, y que producirían una inflamación multifocal en los nervios y en los ganglios de la raíz dorsal. Otra teoría, sin embargo, se basa en la posible existencia de una “grieta” en la barrera entre la sangre y el nervio por la que entrarían monocitos activados y citoquinas pro-inflamatorias en exceso que inducirían la liberación de más citoquinas y quemoquinas con el consiguiente daño axonal y de los ganglios de la raíz dorsal ^[Keswani].

El papel que juega el propio VIH no está bien definido, se ha considerado siempre que la replicación del VIH-1 en los nervios periféricos y en los ganglios de la raíz dorsal era escasa y parecía estar confinada a monocitos /macrófagos, sin embargo Brannagan y cols demostraron replicación de VIH en las neuronas de los ganglios ^[Brannagan]. Asimismo existe evidencia del efecto neurotóxico del

propio virus o sus genes ^[Thomas] y se ha relacionado la replicación viral sistémica, medida como la CV plasmática, con la intensidad y severidad del dolor ^[Simpson].

Tras la introducción del TARGA a mediados de los años 90 se objetivó un marcado descenso de las complicaciones neurológicas ^[Sacktor]. Sin embargo, la prevalencia de las neuropatías sensoriales asociadas al VIH ha aumentado en relación al empleo en el TARGA de los dideoxínucleótidos d4T, ddI y particularmente ddC. En el estudio MACS, por ejemplo, el TARGA resultó ser un factor asociado de manera independiente con el desarrollo de neuropatía.

Desde que los dideoxínucleótidos fueron empleados en los ensayos clínicos en fase 1, un factor limitante para su uso era la TNA, cuya incidencia estaba relacionada tanto con la dosis como con la duración del tratamiento. Se observó TNA en todos los pacientes que recibieron ddC en dosis >0.04 mg/ Kg/día, en el 80% de los que recibieron 0.04 mg/Kg/día y en un tercio de aquellos que recibieron dosis menores ^[Berger].

En el caso de la estavudina, un estudio randomizado demostró la presencia de TNA en 2-4 meses tras el inicio del tratamiento en el 31% de los pacientes con dosis de 2 mg/Kg/día, en el 15% en aquellos con dosis de 1 mg/Kg/día y en el 6% en los que recibieron 0.5 mg/Kg/día ^[Browne].

El desarrollo de TNA también ha sido asociado al uso de ddI, sin embargo es menos frecuente a dosis terapéuticas ^[Kelleher]. Un estudio inicial sobre el uso combinado de ddI y d4T concluyó que la asociación era segura respecto desarrollo de neurotoxicidad ^[Pollard]. Sin embargo estudios posteriores han demostrado que el riesgo de TNA es mayor con el uso combinado de d4T y ddI que con el uso de cada fármaco por separado ^[Moore 2000]. El uso concomitante de hidroxiurea también incrementa el riesgo de TNA ^[Moore 2000].

Desde el punto de vista clínico y electrofisiológico la TNA es muy similar a la DSP, siendo diferenciadas únicamente por la relación causal entre el empleo de dideoxínucleótidos y la aparición o empeoramiento de la clínica. El tiempo de instauración de la TNA en los ensayos clínicos es entre 1 a 6 semanas después del inicio del tratamiento, dependiendo de la dosis recibida. Tras la retirada del fármaco, dos tercios de los pacientes presentan mejoría de los síntomas de manera progresiva (semanas o meses) tras un periodo inicial de empeoramiento de la sintomatología ^[Blum].

La etiología de la TNA está basada en la toxicidad de los ITINs mediada por la disfunción mitocondrial explicada previamente.

El tratamiento de las neuropatías sensoriales asociadas al VIH-1 es principalmente el control sintomático. En el caso de la TNA, el primer paso es o bien la retirada del fármaco responsable de la toxicidad o bien la disminución de la dosis empleada. Respecto al empleo de fármacos modificadores del dolor, se han realizado múltiples ensayos con amitriptilina y acupuntura ^[Shlay], mexiletina ^[Kemper] e incluso capsaicina tópica ^[Paice] que no han demostrado la superioridad de estos fármacos sobre el placebo para controlar el dolor. El único fármaco que ha mostrado ser efectivo en el control del dolor ha sido la lamotrigina siendo su efecto terapéutico más efectivo en pacientes con TNA que con DSP ^[Simpson 2000 y 2002].

7. Reacciones adversas al tratamiento antirretroviral

Una reacción adversa medicamentosa (RAM) es cualquier respuesta a un medicamento que sea nociva y no intencionada, y que tenga lugar a dosis que se apliquen normalmente en el ser humano para la profilaxis, el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades, o para la restauración, corrección o modificación de funciones fisiológicas. Este término incluye también todas las consecuencias clínicas perjudiciales derivadas de la dependencia, abuso y uso incorrecto de medicamentos, incluyendo las causadas por el uso fuera de las condiciones autorizadas y las causadas por errores de medicación ^[R. D. 1344/2007].

En el contexto de un tratamiento crónico como el TARGA con una toxicidad significativa a corto y largo plazo, la capacidad de predicción de las RAM es de vital importancia.

Las RAM más frecuentes y conocidas del TARGA son las mediadas por la toxicidad mitocondrial de los ITINs (polineuropatía periférica, pancreatitis, lipodistrofia y acidosis metabólica), el rash y la hepatotoxicidad de la nevirapina, la hiperbilirrubinemia del atazanavir, la dislipemia asociada a los IPs, los efectos a nivel de SNC del efavirenz, la tubulopatía del TDF y la reacción de hipersensibilidad del ABC.

Esta última representa el mejor ejemplo de la utilidad de cribados fármaco-genéticos en el tratamiento de la infección por el VIH-1 ^[Phillips]. Aproximadamente entre un 5-8 % de los pacientes en tratamiento con abacavir desarrollan reacciones de hipersensibilidad, que en algunas ocasiones pueden ser mortales. Los síntomas suelen aparecer en las primeras 6 semanas de tratamiento y frecuentemente incluyen fiebre, rash y síntomas gastrointestinales ^[Villarroya // Hetherington]. En 2002, Mallal y cols, descubrieron una clara relación entre marcadores del antígeno leucocitario humano (HLA) y las reacciones de hipersensibilidad del abacavir ^[Mallal 2002].

Desde el año 2009 la detección del HLA-B*5701 se encuentra incluida dentro de las pruebas realizadas en la primera visita del paciente VIH-1 positivo y se recomienda antes de iniciar terapia antirretroviral con abacavir.

B) Farmacogenética de las reacciones adversas asociadas al tratamiento antirretroviral.

1. Conceptos generales sobre Farmacogenética

A principios del siglo XX, Sir Archibald Garrod desarrolló el concepto de la “chemical individuality” para describir la diferente respuesta de determinados pacientes a una misma dosis inocua de fármaco. En la década de los 1950s se demostró la existencia de variaciones genéticas interindividuales responsables de las reacciones adversas a fármacos con dos ejemplos: el desarrollo de anemia hemolítica con el uso de fármacos antimaláricos por el déficit del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y el desarrollo de apnea prolongada tras la administración de succinilcolina debido a un déficit en el enzima pseudocolinesterasa ^[Meyer]. En 1959 el Dr. Vogel acuñó el término farmacogenética y desde entonces el desarrollo de esta disciplina ha sido exponencial.

Sin embargo, demostrar la asociación de causalidad entre un polimorfismo genético y un determinado efecto secundario o reacción adversa resulta complicado y costoso. Muchos estudios farmacogenéticos se centran en el efecto del polimorfismo de un único gen que codifica un enzima y sin embargo la respuesta farmacológica es compleja, interviniendo varios genes relacionados entre ellos y factores no genéticos.

El ADN está formado por 3 billones de pares de bases distribuidos en dos cadenas de polinucleótidos posicionados en antiparalelo repartidos en 23 cromosomas. Las variaciones pueden ser bien sustituciones, deleciones o inserciones de una base o un conjunto de bases o bien variaciones en el número de copias (CNV, siglas en ingles).

La sustitución de una base, donde un nucleótido (A, C, G o T) es reemplazado por otro, es la variación genética más frecuente. Se denominan polimorfismos de nucleótido simple (SNP, siglas en inglés), y son alteraciones de la secuencia de nucleótidos que ocurren cada 100-300 bases. El cambio más frecuente es C→T (Citosina por Timina) ^[Gutiérrez].

La deleción implica la pérdida de uno o más nucleótidos. Si ocurre en las secuencias codificadoras y abarca 1, 2 o un número mayor de nucleótidos no múltiplo de tres, el molde de lectura puede ser interrumpido. La inserción implica la adición de uno o más nucleótidos en un gen. De la misma manera que la deleción, si ocurre en la secuencia codificadora y afecta a un número de nucleótidos no múltiplo de 3, la cadena de lectura se interrumpirá.

En 1991, la expansión de secuencias de repetición de trinucleótidos se identificó como un nuevo mecanismo mutacional. Desde entonces, una serie de trastornos genéticos asociados a un gen se han relacionado con la expansión de secuencias de tripletes. ^[Peter Turnpenny Sian 2007].

Pueden aparecer en la región codificadora, en la región reguladora o en una región no-codificadora del gen. Las mutaciones silentes no afectan a la expresión génica pero pueden originar susceptibilidad a determinadas enfermedades o influir en la respuesta a los fármacos. Sin embargo, todas aquellas mutaciones que conllevan una alteración en la secuencia de aminoácidos y que provocan la ausencia de la proteína o su mal funcionamiento, se asocian con enfermedad o letalidad.

Las asociaciones de múltiples SNP que se heredan de forma conjunta se denominan haplotipos. Éstos proporcionan más información sobre la actividad genética, ya que reflejan la suma de los efectos de los diferentes SNP ^[Gutierrez]. La hipótesis de que exista una susceptibilidad genética para padecer una determinada enfermedad o una determinada toxicidad está basada en estudios realizados en población general ^[Kittles RA].

En el caso de los efectos tóxicos del TARGA, esta susceptibilidad genética se determina en los estudios de asociación de genes, mediante análisis estadísticos donde se intenta relacionar SNP candidatos con una determinada toxicidad ^[Hattersley]. El problema está en que en ocasiones, esta relación no se confirma en estudios posteriores. Las características de una asociación entre un marcador genético y un determinado evento son: evento clínicamente relevante, reproducibilidad, valores predictivos positivos elevados de las asociaciones y validación de los marcadores en cohortes independientes de gran tamaño ^[Tarr].

En el caso del tratamiento antirretroviral, se han descrito diferentes polimorfismos asociados a sus complicaciones metabólicas. Entre ellos, por ejemplo, polimorfismos en los genes que codifican las apolipoproteínas A5, C3 y E. Así un estudio longitudinal realizado en 229 pacientes con infección por VIH-1, relacionó la presencia del alelo 1131C de la APOA5 (APOA5-1131T>C) con una alteración del perfil lipídico más rápida en aquellos pacientes que recibían tratamiento con IPs, presentando un aumento del CT y los TG y un descenso del HDL-c ^[Guardiola]. Fauvel y cols descubrieron una asociación entre niveles elevados de TG y niveles bajos de HDL-c en pacientes VIH-1 varones con las siguientes variantes de la APOC3: APOC3-455C>T, APOC3-482C>T y APOC3+3288C>G ^[Fauvel].

2. Papel de la farmacogenética en las reacciones adversas y los efectos secundarios del tratamiento antirretroviral.

i. Bases genéticas de la toxicidad y los efectos adversos al tratamiento antirretroviral

A pesar de que el desarrollo de nuevos fármacos antirretrovirales ha supuesto un cambio en el manejo de la infección por el VIH-1, la respuesta al tratamiento se ve limitada tanto por la aparición de resistencias del virus frente a los fármacos como por la toxicidad y los efectos secundarios de los mismos.

El tratamiento antirretroviral se caracteriza por diferentes tasas de eventos adversos y de respuesta. Estudios fármaco-cinéticos con ITINs (3TC, d4T y AZT) ^[Panhard 2007] y con IP (nelfinavir e indinavir) ^[Panhard 2005 //Brendel] han mostrado que son factores influyentes en la variabilidad inter-individuo la edad, el sexo, el IMC, el aclaramiento de creatinina y la administración conjunta de otros fármacos (AZT e IP).

Los mecanismos causantes de las diferencias fármaco-dinámicas en el TARGA con relación al sexo, permanecen indeterminados aunque las hipótesis se basan en las diferencias en el peso corporal, la distribución de la grasa, la motilidad gástrica y el aclaramiento de creatinina, la influencia de las hormonas sexuales en el metabolismo de los fármacos, diferencias en la expresión y en la actividad de las proteínas y en los enzimas relacionados con la biotransformación ^[Ofotokun.].

Por otra parte, las variaciones genéticas entre los seres humanos representan una proporción relevante de esta variabilidad. Se han descrito un importante número de asociaciones entre las variantes genéticas en humanos y la predisposición a efectos adversos para algunos antirretrovirales. Además de la ya mencionada relación entre el HLA-B*5701 y la reacción de hipersensibilidad al ABC, se han descrito también polimorfismos asociados con los efectos secundarios a nivel del sistema nervioso central (SNC) del EFV ^[Haas] o con la hiperbilirrubinemia no conjugada del ATZ ^[Rotger Octubre 2005].

ii. Genética de las enzimas de la vía del metabolismo de las pirimidinas

La Timidilato sintasa (TS) es el enzima responsable de la metilación no reversible de dUMP a dTMP que es el precursor del DNA. El gen que codifica la TS (TYMS) está situado en el brazo corto del cromosoma 18. Existe un polimorfismo de repetición en tándem de una secuencia de 28 pares de bases (pb) en la región promotor y el número de repeticiones en tándem afecta a los niveles de la actividad de la TS, mediada a través del efecto de las repeticiones en la traducción a RNA mensajero. Se ha comprobado *in vitro* e *in vivo* que las células homocigotas 3R/3R expresan hasta 2.6 veces más el RNA mensajero de la TS comparadas con las células homocigotas 2R/2R ^[Kawakami]. Los alelos más comunes son los de doble y triple repetición. La prevalencia reportada del genotipo 3R es del 67% en la población china y en el 40% de los blancos y los procedentes del suroeste de Asia ^[Marsh].

La TS compite con la 5,10-metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) por la disponibilidad de metilen-tetrahidrofolato (MTHF). En 2002, Trinh y cols sugirieron la hipótesis de que los polimorfismos de la TS que influyen en la actividad de la enzima, afectarían a los niveles de folato y secundariamente, a los de homocisteína en plasma ^[Trinh] debido a la relación que existe entre ambas vías de síntesis (figura 9). Independientemente del efecto del genotipo de MTHFR C677T, el genotipo 3R de la TS se ha asociado con baja concentración de folato plasmático, y entre los individuos con baja ingesta de folato dietético, con niveles elevados de homocisteína.

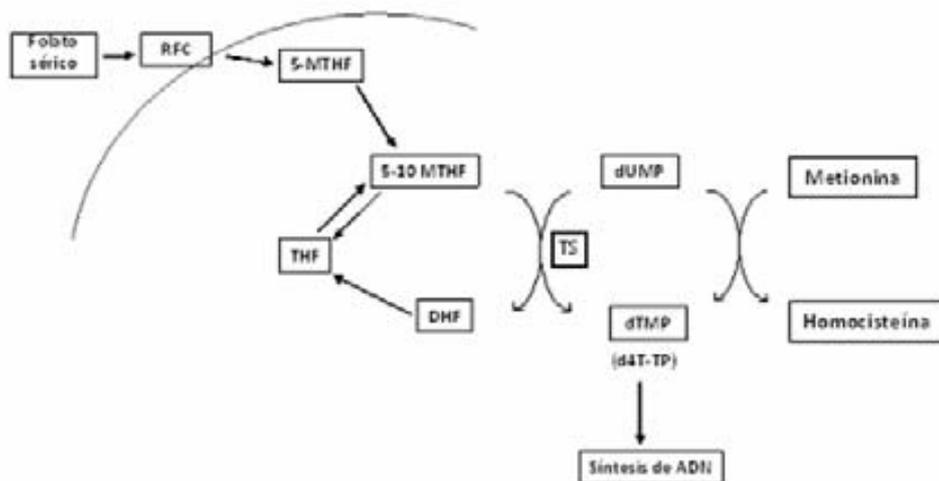


Figura 9. Relación entre la vía de las pirimidinas y la del folato.

También se ha identificado un SNP, G→C, en el 12º nucleótido de la segunda repetición en el alelo 3R, conduciendo a un locus trialelico (2, 3G y 3C), aunque la actividad transcripcional del alelo 3C es similar a la del alelo 2. ^[Mandola]

La TS puede ser regulada a su vez por la actividad de otras enzimas de la vía del folato tales como el transportador de folato reducido tipo 1 (RFC1, siglas en inglés), la MTHFR y la dihidrofolato reductasa (DHFR).

El RFC1 es una proteína transmembrana de la superficie celular que media de manera bidireccional el movimiento del folato a través de la membrana. Tiene mucha más afinidad por los folatos reducidos, incluido el sustrato fisiológico 5-metil-tetra-hidrofolato, por lo que debe operar eficientemente para asegurar la concentración intracelular de folato ^[Wang HG]. Existe un SNP en el exón 2 del gen del RFC1 que resulta en una sustitución de una Guanina por una Adenina ^[Chango] que se ha relacionado con defectos del tubo neural o con la toxicidad y eficacia del tratamiento con metotrexate.

La MTHFR es la enzima responsable de la conversión de 5,10-metil-n-tetrahidrofolato a 5-metil-tetrahidrofolato, que es un co-sustrato para la re-metilación de la homocisteína a metionina.

Se han descubierto diversas variaciones alélicas del gen MTHFR que se han relacionado con patologías tan diversas como la homocistinuria, defectos del tubo neural, riesgo vascular, HTA o síndrome de Down.

El polimorfismo MTHFR C677T resulta en una sustitución de alanina a valina en el dominio catalítico N-terminal de la MTHFR, produciéndose tanto en individuos heterocigotos como en homocigotos un enzima con menor actividad y más termolábil. Un segundo polimorfismo descrito en el gen de la MTHFR A1298C consiste en la transición de una adenosina a una citosina, lo que conlleva una sustitución de Glutamato a Alanina en el dominio regulador C-terminal también produce un enzima con menor actividad pero en menor medida que el anterior polimorfismo ^[Castro]. Ambos pueden producir, por tanto, concentraciones de 5,10-metilenetetrahidrofolato elevadas.

La DHFR convierte el dihidrofolato (DHF) en tetrahidrofolato (THF). La familia de genes DHFR incluye el gen DHFR funcional y cuatro pseudo genes sin intrones (DHFRP1-4). El gen funcional está situado en el cromosoma 5. Recientemente se han descrito 3 polimorfismos en la región promotor

(A-317G, C-680A y C-1610G/T). Un estudio realizado en jóvenes con leucemia linfática aguda halló un nivel de transcripción entre 1.5 y dos veces mayor en los pacientes portadores de los haplotipos *1 (A-317, C-680, C-1610) y *5 (A-317, C-680, G-1610). La presencia de estos haplotipos resultaría en mayores niveles de THF ^[Duloq].

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis es que el desarrollo de HALS en los pacientes VHI positivos en tratamiento antirretroviral con regímenes basados en d4T se debe al aumento de las concentraciones intracelulares de d4T-TP que dependen de la presencia de determinados polimorfismos de los enzimas del metabolismo de las pirimidinas que conllevan una disminución en la actividad de dichos enzimas y por tanto un aumento de dichas concentraciones intracelulares.

Los objetivos son responder a las siguientes preguntas:

1. ¿Los polimorfismos de los enzimas del metabolismo de las pirimidinas, concretamente la TS, que determinan una mayor actividad enzimática, se asocian con mayores concentraciones intracelulares de d4T-TP?
2. ¿Existe una relación causal entre los polimorfismos de los genes de los enzimas del metabolismo de las pirimidinas y el desarrollo de HALS?
3. ¿Cuanto mayor es la concentración de d4T –TP intracelular mayor toxicidad del tejido adiposo?
4. ¿Existe una relación entre las concentraciones intracelulares de d4T-TP y el desarrollo de pancreatitis aguda o neuropatía periférica?

RESULTADOS

1. ARTICULO I

RELATIONSHIP BETWEEN HIV/HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY (HAART)- ASSOCIATED LIPODISTROPHY SYNDROME AND STAVUDINE-TRIPHOSPHATE INTRACELLULAR LEVELS IN PATIENTS WITH STAVUDINE-BASED ANTIRETROVIRAL REGIMENS.

**Domingo P, Cabeza MC, Pruvost A, Salazar J, Gutiérrez M del M, Mateo MG, Domingo JC,
Fernández I, Villarroya F, Muñoz J, Vidal F, Baiget M.**

Clinical Infectious Diseases 2010 Apr 1;50(7):1033-40.

RESUMEN

RELACION ENTRE EL SINDROME DE LIPODISTROFIA ASOCIADO A LA INFECCION POR EL VIH Y AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL DE GRAN ACTIVIDAD (TARGA) Y LOS NIVELES INTRACELULARES DE ESTAVUDINA –TRIFOSFATO EN PACIENTES CON REGIMENES ANTIRRETROVIRALES BASADOS EN ESTAVUDINA.

El tratamiento antirretroviral basado en inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de la timidina (estavudina y zidovudina) se ha relacionado con la aparición del síndrome de lipodistrofia asociado a la infección por el VIH y al tratamiento antirretroviral. Las formas trifosfato (TP) de los ITINs inhiben de manera competitiva la polimerasa α mitocondrial, produciendo la llamada toxicidad mitocondrial, que es una de las causas de los efectos tóxicos de dichos fármacos. Al tratarse de mecanismo competitivo, el efecto dependerá de la dosis y concentración intracelular de los fármacos. En este contexto, nuestra hipótesis es que concentraciones intracelulares de d4T-trifosfato mayores se relacionan con el desarrollo de síndrome de lipodistrofia. Para ello medimos las concentraciones intracelulares de d4T-TP en células de sangre periférica en 33 pacientes que estaban recibiendo tratamiento antirretroviral basado en d4T con un método validado basado en cromatografía líquida en tándem con una espectrometría de masas. La concentración media en pacientes con lipodistrofia era 20.60 fmol/l $\times 10^6$ cels y de 13.85 fmol/l $\times 10^6$ cels ($p= 0.013$). Las dos

variables independientes asociadas al desarrollo de lipodistrofia fueron la presencia de una condición definitiva de SIDA y los niveles intracelulares de d4T-TP.

Este trabajo asocia por primera vez el desarrollo de síndrome de lipodistrofia en pacientes con la infección por VIH-1 con el tratamiento antirretroviral basado en análogos timidínicos.

Relationship between HIV/Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART)-Associated Lipodystrophy Syndrome and Stavudine-Triphosphate Intracellular Levels in Patients with Stavudine-Based Antiretroviral Regimens

Pere Domingo,^{1,*} Maria Carmen Cabeza,^{1,*} Aina Pruvost,¹ Julieta Salazar,² Maria del Mar Gutierrez,¹ Maria Gracia Mateos,¹ Joan C. Domingo,¹ Irene Fernandez,¹ Francesc Villarroya,¹ Jessica Muñoz,¹ Francesc Vidal,¹ and Montserrat Balgat,³

¹Infectious Diseases Unit and ²Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, ³CIBERER (U-30E), and ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, and ⁵Hospital Universitari Joan XXII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; and ⁶CEA, Institut de Biologie et Technologies de Saclay, SP, Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, Evry sur Yvelis, France.

Background. The link between human immunodeficiency virus/highly active antiretroviral therapy (HAART)-associated lipodystrophy syndrome (HALS) and the use of thymidine analogues has been well established. However, to our knowledge, no relationship has been proven between intracellular levels of stavudine (d4T) and HALS.

Methods. We measured peripheral blood mononuclear cell intracellular levels of d4T-triphosphate (TP) in patients who were receiving d4T as part of their antiretroviral regimens. d4T-TP levels were determined by a validated liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay method. The diagnosis of HALS was made in accordance with the criteria of a lipodystrophy severity grading scale. The Student *t* test, Pearson correlations, 1-way analysis of variance with Bonferroni correction, and stepwise logistic regression were used for statistic analyses.

Results. This was a cross-sectional study. There were 33 patients: 17 with HALS and 16 without HALS. The median concentration of d4T-TP for patients with HALS was 20.60 femtomoles (fmol)/ 1×10^6 cells (interquartile range [IQR], 14.90–26.92 fmol/ 1×10^6 cells) and for patients without HALS was 13.85 fmol/ 1×10^6 cells (IQR, 8.65–20.15 fmol/ 1×10^6 cells) ($P = .013$). The median d4T-TP intracellular level in patients who had developed an AIDS-defining condition was 22.50 fmol/ 1×10^6 cells (IQR, 15.80–27.37 fmol/ 1×10^6 cells) and in those who had not was 14.40 fmol/ 1×10^6 cells (IQR, 10.80–20.40 fmol/ 1×10^6 cells) ($P = .037$). There were no statistically significant differences in d4T-TP intracellular levels with respect to the presence of metabolic syndrome, the clinical form of HALS (pure lipotrophic vs mixed), the degree of facial lipostrophy, the presence of hepatitis C virus infection, and the pair of nucleosides in HAART. d4T-TP levels correlated only with cumulative d4T exposure in time and dose. d4T-TP intracellular levels were independently associated with HALS (odds ratio, 1.58; 95% confidence interval, 1.08–2.32; $P = .019$).

Conclusions. Intracellular levels of d4T-TP are strongly associated with the development of HALS.

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)/highly active antiretroviral therapy (HAART)-associated lip-

odystrophy syndrome (HALS) is a major health problem in HIV-1-infected patients, with an estimated prevalence of 24%–60% of treated patients [1–3]. The current view suggests that nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NRTIs) greatly contribute to the syndrome [1, 2]. Thymidine analogues, namely zidovudine (AZT) and stavudine (d4T), have been the most implicated in the development of HALS in randomized clinical trials [4, 5], and there is considerable evidence from *in vitro* and *ex vivo* studies that link the use of these drugs to the appearance of mitochondrially driven

Received 16 September 2003; accepted 10 November 2003; electronically published 1 March 2004.

* P. D. and M. C. C. contributed equally to this article.

Reprints or correspondence: Dr Pere Domingo, Infectious Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Av Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain (pdomingo@hsanipau.cat).

Clinical Infectious Diseases 2004;30:1032–1040

© 2004 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.
1093-4029/2004/3003-1032-09\$15.00

DOI: 10.1093/cid/cih117

toxic effects [4, 5]. It is known that NRTI triphosphate (TP) concentrations exert both antiretroviral and toxic effects, the latter by competitive inhibiting of DNA polymerase γ in vivo [6]. This mechanism of toxicity is a selectivity and/or specificity problem, and therefore toxicity will strongly depend on drug dose and concentration.

Factors that determine the intracellular concentration of the NRTI-TP derivatives include the dose received by the patient, the activity of nucleoside transporters, and the cellular activation state [7]. Furthermore, if mitochondrial toxicity has to develop, then the activity of kinases which phosphorylate NRTIs, the state of nucleotide carrier protein that shuttles nucleotides from cytoplasm to mitochondria, and the speed of excision of the NRTIs' monophosphate forms from polymerase γ , must be taken into account [7].

In this study, we assessed the relationship between d4T-TP intracellular levels and the presence of HALS in HIV-1-infected patients whose antiretroviral regimens contained this drug. Our working hypothesis was that intracellular d4T-TP concentrations may modulate the cytotoxic effects of this drug. Because HALS is a major toxicity of chronic therapy with d4T, the aim of the present study was to look for a relationship between intracellular d4T-TP concentrations and the presence of HALS.

PATIENTS AND METHODS

Subjects. All patients were recruited from 1 July 2008 through 31 January 2009 through the same HIV-1 infection clinic at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) and were consecutive patients with an established diagnosis of HIV-1 infection. Patients were eligible regardless of whether they had HALS if they were currently receiving d4T as part of their antiretroviral regimens. A normal dose of d4T was 40 mg twice daily if the patient weighed ≥ 60 kg and 30 mg twice daily if the patient weighed < 60 kg, whereas a reduced dose was 30 mg twice daily if the patient weighed ≥ 60 kg and 20 mg twice daily if the patient weighed < 60 kg. Patients who were hospitalized or who had a frank cognitive impairment, such as delirium or dementia, on enrollment were not eligible. In addition, patients with current opportunistic infections, neoplasms, or fever of undetermined origin were excluded from the study. At the time of study entry, no patient used any other drug known to influence glucose metabolism or fat distribution, such as anabolic hormones, systemic corticosteroids, recombinant human growth hormone, or appetite stimulants. Informed consent was obtained from the patients at study entry. The diagnosis of AIDS was based on the 1993 revised case definition of the Centers for Disease Control and Prevention [8]. The study was approved by the hospital ethics committee.

Body composition measurements. Subjects were weighed on calibrated scales after removing shoes, outdoor clothing, and other heavy items. Body mass index (BMI) was calculated

by dividing the weight in kilograms by the square of the height in meters. Waist circumference was measured to the nearest millimeter by means of anatomical landmarks as defined by the Third National Health and Nutrition Evaluation Survey [9].

Whole body dual energy x-ray absorptiometry (DEXA) scans (Hologic QDR-4500A; Hologic) were conducted by a single operator for all patients. The percentage of fat at the arms, legs, and central abdomen (calculated from the mass of fat vs lean and bone mass) as well as the total lean body mass in kilograms was recorded.

Definition of HALS and metabolic syndrome. Lipotrophy was identified by patient self-reporting and/or clinician observation of relevant changes to the face (loss of cheek and/or preauricular fat pads), arms, legs, and subcutaneous abdominal tissue, and it was confirmed clinically by qualitative physical examination. Lipohypertrophy was diagnosed by the presence of central adiposity (defined by a waist:hip ratio of > 0.90 in men and > 0.80 in women [9]), breast enlargement in women, or the appearance of cervical fat pads or supraclavicular fat accumulation [10]. Lipotrophy and lipohypertrophy occurred both in an isolated manner and concomitantly, and any combination of them was considered to be a mixed syndrome.

Visual aspects of lipodystrophy were assessed with a lipodystrophy severity grading scale (LSGS) based on that reported by Lichtenstein et al [10]. The degree of lipotrophy and diffuse fat accumulation at each region was rated as absent (score of 0), mild (noticeable on close inspection; score of 1), moderate (readily noticeable by patient and/or physician; score of 2), or severe (readily noticeable to a casual observer; score of 3). The overall score was the mean of the sum of the scores given by the patient and the sum of the scores given by the physician for both fat loss and fat accumulation. A clinical diagnosis of lipodystrophy was given to a patient with an overall score > 7 . This score was chosen because it would be the LSGS of a patient with mild fat loss or mild fat accumulation at all the anatomical sites assessed (face, arms, buttocks, legs, abdomen, neck, and breasts) [11]. Also, patients with severe fat changes in ≥ 1 body location were considered to be lipodystrophic [11].

In addition, facial lipotrophy was assessed with the scale of Fontdevila et al [12] that established 4 degrees of facial lipotrophy that range from normal to grade 3 (severe). The metabolic syndrome was defined in accordance with the United States National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines [13] and modified as recommended in the most recent American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement [14].

Biochemistry laboratory measurements. All laboratory investigations were performed as previously described [15].

Measurement of intracellular d4T-TP concentrations. d4T-TP was obtained from Moravsek Biochemicals, and the Cl-ATP (2-chloroadenosine 5'-TP) that was used as the internal

Table 1. Demographic Characteristics and Immunovirological Status of the Population Studied

Variable	No HALS (n = 16)	HALS (n = 17)	P
Age, years	43 (39.0–47.5)	46 (41.0–48.5)	.26
Male sex, no. (%)	13 (81.2)	14 (82.3)	.93
Means of HIV-1 infection, no. (%)			.76
MsM	7 (43.7)	6 (35.3)	
HTSX	3 (18.7)	5 (29.4)	
IDU	6 (37.5)	6 (35.3)	
Years since diagnosis	13 (11.5–20.0)	14 (9.7–16.2)	.52
Smokers, no. (%)	10 (62.5)	14 (82.3)	.36
Alcohol abuse, no. (%)	1 (6.2)	1 (5.9)	.96
Prior AIDS-defining condition, no. (%)	2 (12.5)	11 (64.7)	.002
HCV coinfection, no. (%)	4 (25.0)	7 (43.7)	.26
HBV coinfection, no. (%)	2 (12.5)	1 (6.2)	.54
Current CD4 count, cells/mm ³	474 (391–1076)	504 (402–751)	.48
CD4 increase, cells/mm ³	430 (267–648)	390 (153–697)	.68
Current CD8 count, cells/mm ³	966 (744–1434)	1194 (746–1366)	.72
CD8 increase, cells/mm ³	575 (332–772)	638 (406–867)	.39
Nadir CD4 count <100 cells/mm ³ , %	6 (37.5)	9 (52.9)	.59
Nadir CD4 count <200 cells/mm ³ , %	9 (56.2)	12 (70.6)	.62
Viral load, log ₁₀ copies/mL	1.28 (1.28–1.28)	1.28 (1.28–1.72)	.37
Maximum viral load ≥5 log ₁₀ copies/mL, %	8 (50.0)	7 (41.2)	.87
Viral load decrease, log ₁₀ copies/mL	−3.46 (−2.50 to −5.41)	−3.38 (−1.87 to −3.97)	.59

Note. Data are expressed as median (interquartile range), unless otherwise indicated. HALS, human immunodeficiency virus (HIV)-1/highly active antiretroviral therapy (HAART)-associated lipodystrophy syndrome; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HTSX, heterosexual; IDU, intravenous drug user; MsM, men who have sex with men.

standard (IS) was obtained from Sigma-Aldrich. In brief, after blood samples (~7 mL) were obtained, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were prepared by centrifugation with separation gradient medium (Ficoll Histopaque 1077; Sigma) and immediately stored at approximately −80°C pending analysis. PBMCs were lysed in 1 mL of ice-cold methanol/Tris HCl (0.05 mol/L; pH 5) containing IS (70/30 volume to volume) and, after methanol evaporation, a 40-μL fraction of the remaining solution was injected into the liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) system.

The LC-MS/MS consisted of an LC-20A prominence liquid chromatograph (Shimadzu) connected to a triple-quadrupole mass spectrometer (TSQ Quantum Discovery; Thermo Fisher Scientific) that was operating in the negative electrospray ionization mode for the detection of both d4T-TP and IS [16]. The liquid chromatographic method was used in accordance with a previously published method [17]. In these conditions, retention times were ~3.95 minutes for d4T-TP and ~4.05 minutes for IS. The amount of d4T-TP was determined in the calibrated range of 50–3000 femtomoles (fmol) per pellet of cells. Finally, the PBMCs of each clinical sample were counted using a validated biochemical test as previously described [18] to provide results in fmol/1 × 10⁶ cells.

Statistical analyses. All analyses were performed with SPSS,

version 17.0 (SPSS). Data were expressed as mean ± standard deviation (SD) or as median with interquartile range (IQR). Data that were not normally distributed, as determined by the Kolmogorov-Smirnov test, were logarithmically transformed. For comparison between 2 groups, we used the Student *t* test, Pearson correlations, or 1-way analysis of variance; multiple testing was corrected using the Bonferroni correction. The variables selected to enter into stepwise regression were those that correlated significantly with d4T-TP intracellular levels (after Bonferroni correction for multiple testing). In all statistical tests, *P* < .05 was considered significant.

RESULTS

Population studied. Fifty-nine HIV-1-infected patients who were receiving d4T-based therapy were enrolled. However, d4T-TP levels could not be measured in 26 of these patients because of lymphopenia. There were no statistically significant differences between the whole cohort and the 33 patients studied in terms of demographic, fat, and virological parameters. The demographic characteristics, the means of acquiring HIV-1, and the virological and immunological status of the 33 patients studied are shown in Table 1. There were 27 men (81.8%) and 6 women (18.2%), with a mean age of 45.1 ± 8.4 years (me-

dian, 44.0 years [IQR, 41.0–48.0 years]). Thirteen patients (39.4%) had a prior AIDS-defining condition. No patient was diabetic or was using insulin or hypoglycemic agents.

Antiretroviral drug exposure and immunovirological situation. Most of the patients (28 [84.8%]) had undetectable viral load at the time of the study. The mean CD4 cell count (\pm SD) was 627 ± 311 cells/mm³ (median, 503 cells/mm³ [IQR, 393–800 cells/mm³]). Nadir CD4 cell count was <200 cells/mm³ in 21 patients (63.6%). The maximum viral load was >5 log₁₀ in 15 patients (45.4%). Six (35.3%) of the 17 patients in the HALS group and 8 (50.0%) of the 16 patients in the non-HALS group were receiving reduced d4T doses ($P = .491$). The cumulative exposure to antiretroviral drugs is shown in Table 2.

Diagnosis of HALS and metabolic syndrome. HALS was diagnosed in 17 patients (51.5%), whereas absence of HALS was found in 16 patients (48.5%). All 17 patients with HALS presented with lipodystrophy, but 12 (70.6%) of the 17 had a mixed lipotrophic-lipohypertrophic phenotype. Differences between HALS and non-HALS patients are shown in Table 3.

Ten patients (58.8%) in the HALS group and 7 (43.8%) in the non-HALS group fulfilled the criteria of metabolic syndrome (odds ratio [OR], 1.84; 95% confidence interval [CI], 0.38–9.09; $P = .605$).

Intracellular concentrations of d4T-TP. The median d4T-TP concentration in the whole cohort was 17.00 fmol/ 1×10^6 cells (IQR, 12.02–23.50 fmol/ 10^6 cells). There were no statistically significant differences in d4T-TP levels by sex (for men, 15.20 fmol/ 1×10^6 cells [IQR, 11.05–25.50 fmol/ 1×10^6 cells]; and for women, 20.40 fmol/ 1×10^6 cells [IQR, 14.80–20.90 fmol/ 1×10^6 cells]) ($P = .441$). The median concentration of d4T-TP for patients with HALS was 20.60 fmol/ 1×10^6 cells (IQR, 14.90–26.92 fmol/ 1×10^6 cells) and for patients without HALS was 13.85 fmol/ 1×10^6 cells (IQR, 8.65–20.15 fmol/ 1×10^6 cells) ($P = .013$). For patients with metabolic syndrome, the median intracellular concentration of d4T-TP was 15.20 fmol/ 1×10^6 cells (IQR, 12.02–26.92 fmol/ 1×10^6 cells), and for those without metabolic syndrome, it was 17.95 fmol/ 1×10^6 cells (IQR, 12.45–22.30 fmol/ 1×10^6 cells) ($P = .829$).

Table 2. Antiretroviral Drug Exposure in the Population Studied

Variable	No HALS (n = 16)	HALS (n = 17)	P
ART composition, %			.41
PI-based	9 (56.2)	7 (41.2)	
NNRTI-based	4 (25.0)	3 (17.6)	
3 NRTIs	3 (18.7)	5 (29.4)	
PI + NNRTI	0 (0)	2 (11.8)	
NRTI backbone, %			.97
d4T + 3TC	5 (38.5)	5 (41.7)	
d4T + TDF	6 (46.1)	5 (41.7)	
d4T + ddI	2 (15.4)	2 (16.7)	
ART duration, months	113 (95.5–156.0)	113 (83.7–135.7)	.56
Individual drug exposure			
AZT, months	14.4 (0–21.0)	19.8 (0–24.0)	.60
AZT, g	236.6 (150.0–264.4)	295.6 (115.4–360.0)	.70
d4T, months	102.1 (90.5–125.5)	85.4 (69.5–115.5)	.22
d4T, g	188.3 (153.0–256.2)	167.3 (120.6–223.6)	.47
d4T doses, mg/kg	0.97 (0.85–1.06)	1.0 (0.83–1.12)	.63
3TC, months	64.2 (18.5–108.0)	58.9 (21.0–97.7)	.69
ddI, months	214.2 (144.0–239.4)	177 (91.8–227.7)	.51
ddC, months	0 (0–0)	0 (0–2.0)	.91
ABC, months	2.1 (0–7.3)	6.0 (0–10.3)	.23
TDF, months	13.9 (0–23.2)	6.4 (0–10.5)	.84
EFV, months	16.7 (0–24.8)	23.8 (0–48.7)	.61
NVP, months	34.4 (21.4–72.0)	0 (0–3.4)	.01
PI, months	61.7 (30.5–98.5)	80.5 (46.0–120.2)	.26
NRTI, months	130.6 (120.0–157.0)	123.7 (88.5–150.0)	.80

Note. Data are expressed as median (interquartile range), unless otherwise indicated. ABC, abacavir; ART, antiretroviral therapy; AZT, zidovudine; ddC, zalcitabine; ddI, didanosine; d4T, stavudine; EFV, efavirenz; HALS, human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) highly active antiretroviral therapy (HAART) associated lipodystrophy syndrome; NNRTI, nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse-transcriptase inhibitor; NVP, nevirapine; PI, protease inhibitor; TDF, tenofovir; 3TC, lamivudine.

Table 3. Anthropometric, Metabolic, and Fat Data

Variable	No HALS (n = 16)	HALS (n = 17)	P
Weight, kg	67.0 (57.7–75.0)	71.5 (56.5–76.4)	.90
Body mass index	22.9 (20.7–25.4)	22.4 (19.9–25.6)	.86
Waist:hip ratio	0.93 (0.88–0.95)	0.95 (0.91–1.0)	.07
Median LSGS	2.2 (0–4.5)	9 (6.7–11.6)	.002
Median facial score	0.5 (0–1.5)	2 (1.0–2.0)	.008
Total cholesterol, mmol/L	5.1 (4.0–6.4)	4.9 (3.8–5.7)	.56
Triglycerides, mmol/L	1.8 (1.4–2.2)	2.0 (1.45–2.9)	.35
HDL cholesterol, mmol/L	1.2 (0.95–1.4)	1.1 (0.69–1.4)	.31
LDL cholesterol, mmol/L	2.6 (2.2–4.2)	2.6 (1.7–3.5)	.60
VLDL cholesterol, mmol/L	0.8 (0.6–1.0)	0.9 (0.7–1.1)	.44
Fasting glucose, mmol/L	5.3 (4.7–5.6)	5.6 (4.9–6.1)	.50
Fasting insulin, pmol/L	37.0 (28.0–54.0)	85.0 (53.2–141.2)	.003
HOMA-r	0.7 (0.4–1.0)	1.7 (1.2–2.7)	<.001
Total body fat, g	14,095 (10,512–17,314)	11,084 (9007–11,664)	.026
Total body fat, %	19.2 (15.4–24.2)	16.1 (13.0–19.4)	.040
Trunkal fat, g	8748 (5555–10,402)	8796 (5661–10,199)	.91
Appendicular fat, g	3065 (3244–5580)	2919 (2384–3306)	.004
Trunk:appendicular fat ratio	1.8 (1.4–2.6)	3.0 (2.4–3.4)	.002

Note. Data are expressed as median (interquartile range), unless otherwise indicated. HALS, human immunodeficiency virus-1/highly active antiretroviral therapy (HAART)-associated lipodystrophy syndrome; HDL, high density lipoprotein; HOMA-r, homeostatic model assessment method; LDL, low density lipoprotein; LSGS, lipodystrophy grade severity score; VLDL, very low density lipoprotein.

Patients with a pure lipotrophic phenotype had a median d4T-TP intracellular concentration of 14.80 fmol/ 1×10^6 cells (IQR, 11.15–21.05 fmol/ 1×10^6 cells), whereas patients with a mixed phenotype had a median level of 19.75 fmol/ 1×10^6 cells (IQR, 12.65–26.70 fmol/ 1×10^6 cells) ($P = .329$). We did not find any correlation between d4T-TP intracellular levels and the degree of facial lipotrophy, the presence of hepatitis C virus (HCV) infection, smoking, the pair of NRTIs, or the use of protease inhibitor or nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor (data not shown). The d4T-TP intracellular level in patients who had developed an AIDS-defining condition was 22.50 fmol/ 1×10^6 cells (IQR, 15.80–27.37 fmol/ 1×10^6 cells) and in patients who had not was 14.40 fmol/ 1×10^6 cells (IQR, 10.80–20.40 fmol/ 1×10^6 cells) ($P = .037$). The correlation between d4T-TP intracellular levels and anthropometric, metabolic, fat, and immunovirological parameters is shown in Table 4. A stepwise logistic regression analysis was performed using the presence of HALS as the independent variable and age, sex, BMI, AIDS, duration of HIV-1 infection, gain in CD4 cell count, gain in CD8 cell count, decrease in viral load, presence of hepatitis B virus infection, presence of HCV infection, duration of HAART, cumulative exposure to d4T in months, cumulative exposure to d4T according to dose in milligrams per kilogram, and d4T-TP intracellular concentrations as dependent variables. The variables independently associated with the development of HALS were prior AIDS-defining condition

(OR, 25.95; 95% CI, 1.20–558.83; $P = .038$) and d4T-TP intracellular level (OR, 1.58; 95% CI, 1.08–2.32; $P = .019$).

DISCUSSION

Our study shows an association between the development of features of HALS and the increased intracellular levels of d4T-TP in patients who were receiving a regimen that included d4T. This finding suggests that, whatever the operating mechanism of this increase is, the toxic effects of d4T on the adipose depots may be in part mediated by the intracellular level that d4T-TP can achieve in the cells. In addition, this is in agreement with the competitive mechanism through which the thymidine analogues cause toxic effects on adipose depots.

However, the present study has inherent limitations. First, this is a cross-sectional study, and therefore no causal relationships can be drawn or should be drawn. Second, intracellular d4T-TP levels were measured in PBMCs, whereas the anatomical and biological processes giving rise to HALS occur in the adipose depots. Extrapolating that d4T-TP intracellular levels in PBMCs directly correlate with d4T-TP levels in adipocytes is at least speculative, but there are data that demonstrate that d4T is phosphorylated to their mono-, di-, and TP anabolites, which indicates the presence of kinases in murine adipocytes [19, 20]. When exposed to NRTIs, thymidine analogue anabolites were identified after a 20-minute incubation

Table 4. Correlation of Stavudine-Triphosphate (d4T-TP) Intracellular Level (fmol/1 × 10⁶ cells) and Anthropometric, Metabolic, and Fat Data

Variable	<i>r</i>	<i>P</i>	Age-adjusted		Age and BMI-adjusted	
			<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Age	0.2919	.099				
Body mass index	0.1436	.425	0.071	.695		
Years of infection	-0.0026	.908	-0.140	.436	-0.0688	.721
Waist circumference	0.1987	.267	0.046	.799	0.0240	.896
Waist-hip ratio	-0.0389	.829	-0.2120	.235	-0.2410	.184
Total cholesterol	0.0355	.844	0.0960	.595	0.0850	.642
Triglycerides	0.1612	.370	0.0770	.670	0.0870	.637
HDL cholesterol	-0.2768	.119	-0.3050	.084	-0.2970	.098
LDL cholesterol	-0.1105	.540	-0.1730	.335	-0.1620	.375
VLDL cholesterol	-0.0064	.972	-0.1150	.526	-0.1450	.434
Fasting glucose	0.2806	.114	0.1360	.452	0.2281	.217
Fasting insulin	0.0683	.705	0.0320	.850	0.0536	.775
HOMA- <i>c</i>	0.1033	.567	0.0620	.731	0.0817	.662
LSGS score	0.3603	.079	0.3030	.091	0.3109	.089
Facial lipotrophy score	0.1557	.387	0.1030	.576	0.1204	.519
Fat percentage	-0.0595	.743	-0.2230	.212	-0.1741	.349
Systolic BP, mm Hg	-0.0090	.721	-0.2370	.184	-0.1809	.330
Diastolic BP, mm Hg	0.2610	.311	0.3020	.088	-0.2652	.149
Whole body fat, g	-0.1056	.558	-0.2150	.229	-0.1911	.303
Trunk fat, g	-0.0412	.601	-0.043	.815	-0.0322	.622
Left leg fat, g	-0.0020	.612	-0.1070	.559	-0.1277	.494
Trunk: appendicular fat ratio	-0.2181	.223	-0.1050	.562	-0.1742	.349
CD4 cell count increase	-0.2661	.134	-0.3110	.078	-0.2750	.134
CD8 cell count increase	-0.1175	.515	-0.1580	.380	-0.1236	.508
Viral load decrease	0.2240	.210	0.1260	.484	0.1363	.465
ART duration	-0.3082	.081	-0.3180	.071	-0.2631	.153
d4T exposure, months	-0.5377	.001	-0.5290	.002	-0.5048	.004
d4T exposure, g	-0.4731	.005	-0.4930	.004	-0.4740	.007
d4T exposure, mg/kg	-0.1177	.514	-0.2510	.159	-0.2530	.182

Note. ART, antiretroviral therapy; BP, blood pressure; fmol, femtomoles; HDL, high density lipoprotein; HOMA-*c*, homeostatic model assessment method; LDL, low density lipoprotein; LSGS, lipodystrophy severity grading scale; *r*, correlation coefficient for bivariate analysis; VLDL, very low density lipoprotein.

period, which demonstrates that rapid entry and metabolism of thymidine analogues occurs inside these cells [20]. Overall, these data indicate that the degree of phosphorylation in adipocytes is at least comparable with that observed in PBMCs and lymphoid cell lines [21–24]. Third, the number of patients included in the present study was low, and this may further hamper the validity of our results.

The d4T-TP results are trustworthy because the quantitative method used here presents a mean precision of 9.8% (range, 7.1%–14.4%) and a mean (\pm SD) accuracy (quality control values of the assays) of 101.6% (\pm 10.0%) over the entire calibration range. Moreover, the results obtained in this study are comparable with previously reported findings [25–27].

There is overwhelming epidemiologic evidence to link d4T to the development of fat depot alterations, and the fat toxicity

of this drug is related to its ability to inhibit DNA polymerase γ [6, 7, 28, 29]. After formation, the active NRTI-TP competes with its corresponding natural endogenous 2'-deoxynucleoside-TP (dNTP) and ribonucleoside TP for incorporation by the viral reverse-transcriptase or host DNA polymerases, thus causing suppression of viral replication or toxicity [30]. NRTIs could also cause perturbations in endogenous nucleotide metabolism by causing competitive inhibition, allosteric modulation, or altered expression of nucleotide metabolizing enzymes [31]. Because of the competitive nature of their incorporation by polymerases, changes in NRTI-TP levels, such as those described in the present work, could then alter the activity and toxicity of NRTIs. This point has been demonstrated in vitro in T cell lines that were treated with AZT and, in that model, the extent of dNTP pool increase has been related to

intracellular activation and potency against polymerase α , δ , and ϵ [30].

DNA pol- γ is highly sensitive to inhibition by NRTIs, such as d4T-TP and AZT-TP, dideoxynucleotides, and other antiviral nucleoside analogues [32, 33]. Therefore, a key step in the pathophysiology of NRTI pharmacology and toxicity is regulation of natural deoxyribonucleotide pool sizes in mitochondria that affect mitochondrial DNA (mtDNA) replication. Conversely, dysregulation of phosphorylation and dephosphorylation could affect mtDNA replication. Importantly, changes in enzymes that are involved in these processes may further alter the homeostasis of cell nucleotide pools.

Information with regard to antiretroviral drug levels and their involvement in the pathophysiology of lipodystrophy is scarce. To our knowledge, only one other work concerning nelfinavir has related trough drug levels to the development of lipodystrophy [34]. In the case of NRTIs, the capacity of individual cells (eg, adipocytes) to accumulate d4T-TP can be an important factor that influences toxicity at the cell or tissue level [6]. The elevated cellular activation that is associated with advanced disease has been proposed as a mechanism to explain higher AZT-TP and lamivudine (3TC)-TP concentrations in patients with advanced HIV-1 disease. Cellular activation has been shown to increase AZT and 3TC phosphorylation in vitro [35–39]. The recent finding that a polymorphism (+3954G/T) in the interleukin 1 β gene that is associated with low serum levels of tumor necrosis factor- α and other cytokines has a protective role against the development of HALS suggests that inflammation plays a part in the pathogenesis of HALS [40]. Although we have not formally performed any measurement of cellular activation, these facts could explain why patients with more advanced disease (ie, those who had developed an AIDS-defining condition) had higher d4T-TP levels, compared with the levels of those with less advanced HIV-1 infection. Recently, we demonstrated that genes that encode concentrative nucleoside transporters were upregulated in the fat of patients with HALS [41]. This upregulation correlated with the level of tumor necrosis factor- α , a cytokine with enhanced expression in the adipose tissue of HIV-1-infected patients and a well-known cause of cellular activation [42]. This may contribute to an increased uptake of thymidine analogues into the adipocyte and lead to an imbalance of the intracellular nucleotide pool, thus favoring the toxicity of d4T-TP.

A major determinant of the concentration of a given drug in a given tissue is the dose delivered to the patient. There is clinical evidence that in patients with clinically evident HALS, a decreasing d4T dose led to a decrease in the amount of fat lost during 48 weeks [43]. However, this strategy proved inferior to the strategy of switching from d4T to tenofovir in the same study. This work provides indirect evidence of the importance of drug levels in the development of HALS. Nonetheless, we

were unable to show differences between patients with low d4T doses and patients with normal d4T doses with respect to d4T-TP intracellular levels, although there was a positive correlation between these levels and cumulative exposure to d4T. This may underscore the importance of other pathophysiological processes, such as the upregulation of nucleoside transporters and other, albeit unknown, factors in determining d4T-TP intracellular concentrations.

Since d4T was implicated in the pathophysiology of HALS, it has lost its place as a preferred drug in antiretroviral guidelines, and its use in clinical practice has been steadily decreasing to a marginal role in developed countries. However, in developing countries, d4T, usually in compact pills with 3TC and nevirapine, is among the choices for starting antiretroviral therapy [44, 45]. Therefore, it is reasonable to consider that as the AIDS epidemic continues and as survival with HIV-1 infection is prolonged by HAART, long-term side effects of d4T, including HALS, may become increasingly common. In this context, it should be taken into account that HALS is associated with d4T-TP intracellular levels.

Acknowledgments

Financial support. Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 02/1280, 05/1591, 070976, and 08/00256), Fundación para la Prevención del SIDA en España (FIPSE 36630 and 36572/06), and Red de Investigación en SIDA (RIS RD06/006/0022).

Potential conflicts of interest. All authors: no conflicts.

References

1. Lichtenstein KA. Redefining lipodystrophy syndrome: risks and impact on clinical decision making. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;39:395–400.
2. Bernasconi F, Bouzbak K, Jungens C, et al. Abnormalities of body fat distribution in HIV-infected persons treated with antiretroviral drugs: the Swiss HIV Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;31:50–55.
3. Miller J, Carr A, Emery S, et al. HIV lipodystrophy: prevalence, severity and correlates of risk in Australia. *HIV Med* 2003;4:293–301.
4. Nolan D, Hammond P, James I, McKinnon E, Mallal S. Contribution of nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitor therapy to lipodystrophy from the population to the cellular level. *Antivir Ther* 2003;8:617–626.
5. Nolan D, Beiss P, Mallal S. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection: a review of selected topics. *Expert Opin Drug Saf* 2005;4:201–218.
6. Lewis W, Day B, Copeland WC. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat Rev Drug Discov* 2005;2:812–822.
7. Anderson PL, Kakuda TN, Lichtenstein K. The cellular pharmacology of nucleoside- and nucleotide-analogue reverse-transcriptase inhibitors and its relationship to clinical toxicities. *Clin Infect Dis* 2004;38:743–753.
8. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance for case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 1992;41(RR-17):1–19.
9. Lemieux S, Prud'homme D, Bouchard C, Tremblay A, Despres JF. A single threshold of waist girth identifies normal-weight and overweight subjects with excess visceral adipose tissue. *Am J Clin Nutr* 1998;68:685–693.

10. Lichtner KA, Ward DJ, Meerman AC, et al. Clinical assessment of HIV-associated lipodystrophy in an ambulatory population. *AIDS* 2001; 15:1389–1398.
11. Arenal V, Martín-Roces E, Collazo J, et al. Association between physical and echographic fat thickness assessments and a lipodystrophy grading scale in lipodystrophic HIV patients: practical implications. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22:830–836.
12. Fortdevala J, Martínez E, Rubio-Murillo JM, Milinkovic A, Serra-Renom JM, Gatell J. A practical classification for the surgical filling of facial lipodystrophy. *Antivir Ther* 2005; 10:128.
13. 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; 285:2486–2497.
14. Grundy SM, Cleeman Jr, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005; 112:2735–2752.
15. Moreno-Torres A, Domingo F, Pujol J, Blanco-Vaca F, Arroyo JA, Sambonet MA. Liver triglyceride content in HIV-1-infected patients on combination antiretroviral therapy studied with ¹H-MR spectroscopy. *Antivir Ther* 2007; 12:193–203.
16. Pruvost A, Becker F, Bardouille F, et al. Direct determination of phosphorylated intracellular analogs of stavudine (d4T) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001; 15:1401–1408.
17. Pruvost A, Théodorou F, Agrofoglio L, Negrado E, Bensch H. Specificity enhancement with LC-positive ESI-MS/MS for the measurement of nucleosides: application to the quantitative determination of carbostyri triphosphate, lamivudine triphosphate and tenofovir diphosphate in human peripheral blood mononuclear cells. *J Mass Spectrom* 2006; 41(2): 224–233.
18. Bensch HF, Théodorou A, Herbet N, et al. Peripheral blood mononuclear cell counting using a DNA-detection-based method. *Anal Biochem* 2004; 330:171–174.
19. Vial GJ, Back DJ. Metabolism of zidovudine. *General Pharmacology* 1993; 26:1467–1475.
20. Jansch O, Hoggard PG, Tjia JE, et al. Intracellular disposition and metabolic effects of zidovudine, stavudine and four protease inhibitors in cultured adipocytes. *Antivir Ther* 2003; 8:417–426.
21. Hoggard PG, Kwon S, Barry MG, Khoo SH, Back DJ. Effects of drugs on 2',3'-dideoxy-2',3'-dihydrothymidine phosphorylation *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1231–1236.
22. Hoggard P, Khoo S, Barry M, Back D. Intracellular metabolism of zidovudine and stavudine in combination. *J Infect Dis* 1996; 174:671–672.
23. Kwon S, Hoggard PG, Sales SD, et al. Development of enzymatic assays for quantification of intracellular lamivudine and carbostyri triphosphate levels in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 135–143.
24. Sales SD, Hoggard PG, Sunderland D, Khoo S, Hart GA, Back DJ. Zidovudine phosphorylation and mitochondrial toxicity *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 177:54–58.
25. Becker F, Pruvost A, Goujard C, et al. Improved method for the simultaneous determination of d4T, 3TC and ddI intracellular phosphorylated analogs in human peripheral-blood mononuclear cells using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002; 16:553–563.
26. Salmon-Ceron D, Lussalle B, Pruvost A, et al. COPIST-ANRS HC1 Study Group. Interferon-ribavirin in association with stavudine has no impact on plasma human immunodeficiency virus (HIV) type 1 level in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus: a COPIST-ANRS HC1 trial. *Clin Infect Dis* 2003; 36:1295–1304.
27. Compin S, Durand-Gasselin I, Guast J, Bensch H. Improved method to quantify intracellular zidovudine mono- and triphosphate in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2007; 42:389–404.
28. Nolan D, Mallal S. Complications associated with NRTI therapy: update on clinical features and possible pathogenic mechanisms. *Antivir Ther* 2004; 9:849–863.
29. Mallal S, John M, Moore CB, James IR, McKinnon EJ. Contribution of nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors to substance-use in patients with HIV infection. *AIDS* 2000; 14:1309–1316.
30. Wia JE, Miller MD, Rhodes GR, Ray AS. Effect of nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitors of HIV on endogenous nucleoside pools. *Antivir Ther* 2006; 13:789–797.
31. Ray AS. Intracellular interactions between nucleos(t)ide inhibitors of nucleoside reverse-transcriptase. *AIDS Rev* 2005; 7:113–123.
32. Vengchareon S, Carron M, Auclair M, et al. Mitochondrial toxicity of didanosine, stavudine and zidovudine involves multiple cellular targets in white and brown adipocytes. *Antivir Ther* 2007; 12:919–929.
33. Villarroya F, Domingo F, Gimh M. Lipodystrophy in HIV-1-infected patients: lessons for obesity research. *Int J Obes (Lond)* 2007; 31:1763–1776.
34. Tölleyer JM, Morlat JF, Dinet J, et al. High concentrations of nevirapine as an independent risk factor for lipodystrophy in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:4009–4012.
35. Barry M, Wild M, Vial G, et al. Zidovudine phosphorylation in HIV-infected patients and seronegative volunteers. *AIDS* 1994; 8:F1–F5.
36. Anderson PL, Kakuda TN, Kaveh S, Fletcher CV. Antiviral dynamics and sex differences of zidovudine and lamivudine triphosphate concentrations in HIV-infected individuals. *AIDS* 2003; 17:2159–2168.
37. Gao WY, Shimizu T, Johns DG, Broder S, Mitsuya H. Differential phosphorylation of acidothymidine, didoxycytidine, and didoxystyrosine in resting and activated peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 1983; 91:2326–2333.
38. Gao WY, Agbaria R, Driscoll JS, Mitsuya H. Divergent antihuman immunodeficiency virus activity and anabolic phosphorylation of 2',3'-dideoxynucleoside analogs in resting and activated human cells. *J Biol Chem* 1984; 259:12633–12638.
39. Anderson PL, Zhang JH, King T, et al. Concentrations of zidovudine- and lamivudine-triphosphate according to cell type in HIV-seronegative adults. *AIDS* 2007; 21:1849–1854.
40. Arenal V, Rago C, Morice AH, et al. IL-1β (+3754C/T) polymorphism could protect human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients on highly active antiretroviral treatment (HAART) against lipodystrophic syndrome. *Genet Med* 2008; 10:215–222.
41. Gaillar JP, Caro-Soldado E, Aymech I, et al. Altered expression of nucleoside transporter genes (SLC28 and SLC29) in adipose tissue from HIV-1-infected patients. *Antivir Ther* 2007; 12:859–863.
42. Gimh M, Domingo F, Gaillar JP, et al. HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy. *Antivir Ther* 2006; 11:729–740.
43. Milinkovic A, Martínez E, López S, et al. The impact of reducing stavudine dose versus switching to tenofovir on plasma lipids, body composition and mitochondrial function in HIV-infected patients. *Antivir Ther* 2007; 12:407–415.
44. Zhou J, Paton NI, Diangeso R, et al. Experience with the use of a first-line regimen of stavudine, lamivudine and nevirapine in patients in the TREAT Asia HIV Observational Database. *HIV Med* 2007; 8:8–16.
45. Colebunders R, Kanyo MR, Laurence J, et al. First-line antiretroviral therapy in Africa—how evidence-based are our recommendations? *AIDS Rev* 2005; 7:148–154.

2. ARTICULO II

ASSOCIATION OF THYMIDYLATE SYNTHASE GENE POLYMORPHISMS WITH STAVUDINE INTRACELLULAR LEVELS AND LIPODYSTROPHY.

Domingo P, Cabeza MC, Pruvost A, Torres F, Salazar J, del Mar Gutiérrez M, Mateo MG, Fontanet A, Fernández I, Domingo JC, Villarroya F, Vidal F, Baiget M.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy.2011 Apr;55(4):1428-35

RESUMEN:

ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA TIMIDILATO SINTASA CON LOS NIVELES INTRACELULARES DE ESTAVUDINA Y LIPODISTROFIA.

El efecto tóxico de los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de la timidina está basado en la toxicidad mitocondrial de sus formas trifosfato a través de la inhibición competitiva de la polimerasa α mitocondrial. La concentración intracelular de los fármacos puede estar relacionada con los efectos tóxicos.

En un estudio previo encontramos una relación entre el desarrollo de síndrome de lipodistrofia y las concentraciones intracelulares de estavudina-trifosfato (d4T-TP). Nuestra hipótesis está basada en que los polimorfismos de los enzimas del metabolismo de las pirimidinas pueden influir en las concentraciones intracelulares de d4T-TP y mediante la alteración de la relación entre los pools de nucleótidos naturales y formas trifosfato de los ITINs, pueden influir en el efecto tóxico de éstos últimos.

Realizamos un estudio transversal de 33 pacientes que estaban recibiendo TARGA basado en d4T. Medimos las concentraciones intracelulares de d4T-TP en células mononucleares de sangre periférica mediante la asociación de una cromatografía líquida con un espectrómetro de masas triple-cuádruple. Determinamos la presencia de los polimorfismos de la Timidilato Sintasa (TS), metil-n-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), la dihidrofolato reductasa (DHFR) y el transportador de

folato reducido tipo 1 (RFC1) mediante secuenciación directa empleando un analizador genético ABI Prism 3100.

En el caso de la TS distinguimos entre polimorfismos de alta expresión del ARNm y por tanto mayor actividad (2/3G, 3C/3C y 3G/3G) y polimorfismos de baja expresión (2/2, 2/3C y 3C/3C). Los polimorfismos asociados a menor actividad de la TS se asociaron con concentraciones intracelulares de d4T-TP mayores (21.40 fmol/10⁶ céls vs 11.50 fmol/10⁶ céls; p<0.0001). Los polimorfismos de los genes asociados al resto de enzimas del metabolismo de las pirimidinas estudiados, no presentaron relación estadísticamente significativa con las concentraciones intracelulares de d4T-TP.

Nuestro trabajo muestra una relación entre los polimorfismos de la TS y las concentraciones intracelulares de d4T-TP, y por tanto con el desarrollo de síndrome de lipodistrofia en pacientes con infección por VIH-1 que reciben TARGA basado en análogos de la timidina.

Association of Thymidylate Synthase Gene Polymorphisms with Stavudine Triphosphate Intracellular Levels and Lipodystrophy[†]

Pere Domingo,^{1*} M. Carmen Cabeza,¹ Alain Pruvost,² Ferran Torres,³ Juliana Salazar,⁴
M. del Mar Gutierrez,¹ M. Gracia Mateo,¹ Angels Fontanet,¹ Irene Fernandez,¹
Joan C. Domingo,⁵ Francesc Villarroya,⁵ Francesc Vidal,⁶
and Montserrat Baiget⁴

Infectious Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, and Red de Investigación en SIDA (RIS), Barcelona, Spain¹; CEA, iBiTecS, SPI, Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, Gif sur Yvette F-91191, France²; Statistics & Methodology Support Unit (USEM), IDIBAPS (Hospital Clínic), Laboratory of Biostatistics & Epidemiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain³; Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, U-705 CIBERER, Barcelona, Spain⁴; Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain, and CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición, Barcelona, Spain⁵; and Infectious Diseases Unit, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain⁶

Received 16 November 2010/Returned for modification 27 December 2010/Accepted 17 January 2011

The antiviral activity and toxicity of stavudine (d4T) depend on its triphosphate metabolite, stavudine triphosphate (d4T-TP). Therefore, modifications in intracellular levels of d4T-TP may change the toxicity profile of stavudine. d4T-TP intracellular levels in peripheral blood mononuclear cells were determined with a prominence liquid chromatograph connected to a triple-quadruple mass spectrometer. Polymorphisms in the thymidylate synthase (TS), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), dihydrofolate reductase (DHFR), reduced folate carrier 1 (RFC1; SLC19A1), and cyclin D1 (CCND1) genes were determined by direct sequencing using an ABI Prism 3100 genetic analyzer or Fluidigm's Biomark system. The Mann-Whitney test, rank analysis of variance (with Bonferroni's adjusted *post hoc* comparisons), and logistic regression were used for the inferential analyses. Thirty-three stavudine-treated patients were enrolled in this cross-sectional study. d4T-TP intracellular levels were 11.50 fmol/10⁶ cells (interquartile range [IQR] = 8.12 to 13.87 fmol/10⁶ cells) in patients with a high-expression TS genotype (2/3G, 3C/3G, and 3G/3G), whereas in those with a low-expression TS genotype (2/2, 2/3C, and 3C/3C), they were 21.40 fmol/10⁶ cells (IQR = 18.90 to 27.0 fmol/10⁶ cells) ($P < 0.0001$). Polymorphisms in the MTHFR, DHFR, RFC1, and CCND1 genes did not influence the intracellular concentration of d4T-TP. d4T-TP levels were independently associated with the TS genotype (low versus high expression; odds ratio [OR] = 86.22; 95% confidence interval [CI] = 8.48 to nonestimable; $P = 0.0023$). The low-expression TS genotype was associated with the development of HIV/highly active antiretroviral therapy-associated lipodystrophy syndrome (HALS) (OR = 14.0; 95% CI = 2.09 to 108.0; $P = 0.0032$). Our preliminary data show that polymorphisms in the thymidylate synthase gene are strongly associated with d4T-TP intracellular levels and with development of HALS.

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)/highly active antiretroviral therapy (HAART)-associated lipodystrophy syndrome (HALS) is a major health problem in HIV-1-infected patients, with an estimated prevalence of 24 to 60% among treated patients (31, 37). Although its pathogenesis is incompletely understood, the theories based on drug toxicity have been considered the most plausible ones, and the current view suggests that nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) contribute to the syndrome (47). Thymidine analogues, namely, zidovudine (AZT) and stavudine (d4T), have most often been implicated in the development of HALS in randomized clinical trials (16), and there are a number of

pieces of evidence from *in vitro* and *ex vivo* studies linking the use of these drugs with the appearance of mitochondrially driven toxic effects (29). It is known that NRTI triphosphate concentrations exert both antiretroviral and toxic effects, with the latter occurring by competitive inhibition of DNA polymerase γ *in vivo* (1). This mechanism of toxicity is a selectivity/specificity problem, and therefore, toxicity strongly depends on drug dose and concentration. As such, elevations in NRTI triphosphate concentrations will significantly impact the mitochondrial toxicity of NRTIs.

Thymidylate synthase (TS; *N*⁵,*N*¹⁰-methylene tetrahydrofolate:dUMP C-methyltransferase; EC 2.1.1.45) catalyzes the nonreversible methylation of dUMP to dTMP, a precursor for DNA synthesis. Therefore, it is a key enzyme of *de novo* thymidylate synthesis and is responsible for providing the thymine nucleotides required for DNA synthesis (24), although TK1 and TK2 recycle deoxythymidine arising from cell turnover or diet, thereby restricting the requirement for the highly ener-

* Corresponding author. Mailing address: Infectious Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Mas Casanovas 94, 08025 Barcelona, Spain. Phone: 34935565609. Fax: 34935565938. E-mail: pdomingo@santpau.es.

[†] Published ahead of print on 31 January 2011.

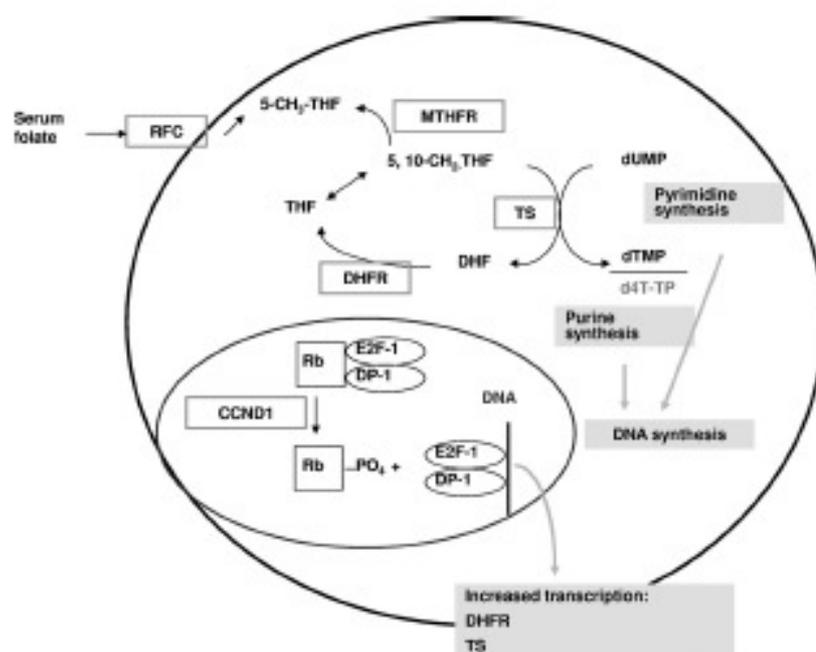


FIG. 1. Simplified illustration of folate metabolism. The genes analyzed, the transporter protein RFC1, the regulatory enzyme MTHFR, the drug target TS, and DHFR, are denoted by rectangles. On the lower left-hand side, a scheme of the role of CCND1 in transcription regulation is shown. 5-CH₂-THF, methyltetrahydrofolate; 5,10-CH₂-THF, methylenetetrahydrofolate; Rb, retinoblastoma.

getically expensive *de novo* synthesis (salvage pathway) (32). The TS gene encoding this enzyme is polymorphic, having either double or triple tandem repeats of a 28-bp sequence in the promoter region. It has been demonstrated that homozygous 3/3 cells overexpressed TS mRNA compared with the level of expression by homozygous 2/2 cells (24, 25). More recently, a single nucleotide polymorphism (SNP), G → C, has been described at the 12th nucleotide of the second repeat of the 3R allele, leading to a triallelic locus (2, 3G, and 3C) (34). The 3C allele showed transcriptional activity that was similar to that of the 2 allele.

In the folate pathway, the activities of other enzymes, such as reduced folate carrier 1 (RFC1), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), and dihydrofolate reductase (DHFR), can regulate TS activity in a coordinated manner for efficient folate metabolism: folate → dihydrofolate (DHF) → tetrahydrofolate (THF) ↔ methylenetetrahydrofolate → methyltetrahydrofolate (Fig. 1). MTHFR catalyzes the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate. This enzymatic reaction generates methyl residues essential for TS function. A 677C → T transition in the gene, which results in an alanine-to-valine substitution in the predicted catalytic domain of MTHFR, and a 1298A → C transition, which results in a glutamine-to-alanine substitution within a presumed regulatory domain of the protein, have been described. Both genetic changes have been associated with decreased activity of MTHFR, which would result in higher concentrations of 5,10-methylenetetrahydrofolate (14, 49).

DHFR converts the DHF generated by the action of TS into THF. Three polymorphisms within the promoter have been described, and gene reporter studies have shown a 1.5- to 2-fold higher level of transcription for haplotype *1 (A-317,

C-680, C-1610) and haplotype *5 (A-317, C-680, G-1610) than for the remaining haplotypes. Thus, the presence of these haplotypes would result in higher levels of THF (12). Additionally the increase in the transcription level of several of the above-mentioned genes (TS, DHFR) can be associated with the action of the transcription factors E2F-1 and DP-1. Cyclin D1 (CCND1) intervenes in the retinoblastoma protein phosphorylation, releasing E2F-1 and DP-1 (Fig. 1). The polymorphism 870A → G in CCND1 changes the splice donor site between the exon 4 and intron 4 boundary, leading to an alternatively spliced cyclin D1 transcript. The transcript associated with the A allele results in a protein with a longer half-life able to release higher levels of the transcription factors E2F-1 and DP-1 (5).

Since we found in a previous study that HALS is associated with increased d4T triphosphate (d4T-TP) intracellular levels (11), our working hypothesis for the present work was that variations in genes involved in the above-mentioned pathways may influence intracellular d4T-TP concentrations, eventually altering the nucleotide pools, and in this way may modulate the toxic effects of this drug. Therefore, the aim of the present study was to look for a relationship between genetic polymorphisms in the TS-, MTHFR-, DHFR-, RFC1-, and CCND1-encoding genes, d4T-TP intracellular levels, and HALS.

MATERIALS AND METHODS

Population studied. All patients were recruited at the same HIV-1 infection clinic at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, which attends to a population of 1,455 HIV-1-infected patients on active follow-up, and were consecutive patients with an established diagnosis of HIV-1 infection on treatment. Patients were eligible either if they had or did not have HALS and were at the time receiving therapy with d4T as part of their antiretroviral regimes. Subjects who

were hospitalized or who had a frank cognitive impairment such as delirium or dementia on enrollment were not eligible. Patients with opportunistic infections, neoplasms, or fever of undetermined origin were excluded from the study too. At the time of study entry, no patient used any other drug known to influence glucose metabolism or fat distribution, such as anabolic hormones or systemic corticosteroids, uridine, recombinant human growth hormone, or appetite stimulants. Informed consent was obtained from the patients at study entry. The diagnosis of AIDS was based on the 1993 revised case definition of the Centers for Disease Control and Prevention (7). The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Body composition measurements. Subjects were weighed on calibrated scales after they removed their shoes, outdoor clothing, and other heavy items. Body mass index (BMI) was calculated by dividing the weight (in kilograms) by the square of the height (in meters). Waist circumference was measured to the nearest millimeter using anatomical landmarks, as defined for the Third National Health and Nutrition Evaluation Survey (27).

Whole-body dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) scans (QDR-4500A; Hologic, Inc., Waltham, MA) were conducted by a single operator on all the patients. The percent fat at the arms, legs, and central abdomen (calculated from the mass of fat versus lean and bone mass) as well as total lean body mass (in kilograms) was recorded.

Definition of HALS and metabolic syndrome. The presence or absence of lipodystrophy, lipohypertrophy, and mixed syndrome was determined as previously described (11). The metabolic syndrome was defined according to the U.S. National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III Guidelines (13) and modified as recommended in the latest American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement (20). Metabolic syndrome was defined as having three or more of the following metabolic risk factors: (i) central obesity (waist circumference, ≥ 80 cm in women and ≥ 90 cm in men), (ii) hypertriglyceridemia (fasting triglyceride level, ≥ 1.69 mmol/liter), (iii) low high-density cholesterol (HDL) level (fasting HDL level, < 1.29 mmol/liter in women and < 1.04 mmol/liter in men), (iv) hyperglycemia (fasting glucose level, ≥ 5.6 mmol/liter, or already taking oral hypoglycemic agents for treatment of type 2 diabetes), and (v) hypertension (sitting blood pressure, $\geq 130/85$ mm Hg, taken as the mean of two readings taken after rest for at least 10 min, or taking regular antihypertensive medications).

Biochemistry laboratory measurements. All laboratory investigations were performed after a 12-h overnight fast and at least 15 min after the placement of a peripheral intravenous catheter. Patients were seated during blood drawing and abstained from smoking at least 15 min before sampling; tourniquet use was avoided when possible and, if not, was maintained for less than 1 min. All lipid measurements were performed in a Hitachi 911 system from Roche (Basel, Switzerland). Serum total cholesterol and triglyceride levels were measured by the fully enzymatic standard method, and high-density lipoprotein cholesterol was measured by a direct method using polyethylene glycol-modified enzymes (PEGMEs) (45). Low-density lipoprotein (LDL) cholesterol was measured after ultracentrifugation, according to the Lipid Research Clinic-recommended method, but utilizing the PEGME method for HDL cholesterol instead of precipitation. Very low-density lipoprotein cholesterol was measured in the fraction of d (density) of < 1.006 kg/liter of the ultracentrifugation (23). Insulin resistance was estimated by the homeostasis model assessment method (HOMA-R) as the product of the fasting concentrations of plasma insulin ($\mu\text{U/ml}$) and plasma glucose (mmol/liter) divided by 22.5 (36). A cutoff value of 3.8 was used for defining insulin resistance (2).

Measurement of intracellular d4T triphosphate concentrations. d4T-TP was from Moravik Biochemicals (CA), and 2-chloroadenosine 5'-triphosphate (Cl-ATP), used as the internal standard (IS), was from Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France). In brief, after 2 blood samples (about 7 ml) were obtained, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were prepared by centrifugation with separation gradient medium (Ficoll Hisopaque 1077; Sigma) and immediately stored at a temperature of about -80°C pending analysis. The first of the 2 samples was taken 3 h after dosing (to measure the maximum concentration in plasma [C_{max}]), and the second was taken 12 h after dosing (to measure the trough concentration in plasma [C_{trough}]). Our analysis, as prespecified in the study protocol, was based on C_{trough} , and these concentrations are used throughout this report. PBMCs were lysed in 1 ml of ice-cold methanol-0.05 M Tris-HCl, pH 5 (70:30, vol/vol), containing IS, and after methanol evaporation, a 40-ml fraction of the remaining solution was injected into a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) system.

The LC-MS/MS system consisted of an LC-20A prominence liquid chromatograph (Shimadzu, Champs sur Marne, France) connected to a triple-quadrupole mass spectrometer (TSQ Quantum Discovery; Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) operating in the negative electrospray ionization (ESI) mode for

the detection of both d4T-TP and IS (40). The liquid chromatographic method was performed according to a previously published method (41). Under these conditions, retention times were about 3.95 and 4.05 min for d4T-TP and IS, respectively. The amount of d4T-TP was determined in the calibrated range of from 50 to 3,000 fmol per cell pellet. Finally, the PBMCs of each clinical sample were counted using a validated biochemical test as previously described (4) in order to provide results in fmol/ 10^6 PBMCs.

Genotyping analyses. The genomic DNA was extracted from the peripheral leukocytes by the salting-out procedure (38). The TS gene was analyzed for the variable-number tandem repeat (VNTR) of a 28-bp polymorphism and the G \rightarrow C SNP in the first and second repeats. A DNA fragment was amplified using previously described PCR conditions and primers (11) and directly sequenced using an ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). This G-to-C substitution changes a critical residue in the upstream stimulatory factor (USF) E-box consensus element, abolishes USF-1 binding, and alters transcriptional activity. The TS genotypes of the patients were classified into two groups, as described by Kawakami and Watanabe: high-expression type (2/3G, 3C/3G, and 3G/3G) and low-expression type (2/2, 2/3C, and 3C/3C) (26).

The following polymorphisms in the DHFR gene were analyzed: (i) 1610G \rightarrow T (rs1650694) by direct sequencing using an ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems); (ii) a 19-bp insertion/deletion (ins/del) using a conventional PCR method (9), (iii) a 317A \rightarrow G (rs408626) substitution, and (iv) a 680C \rightarrow A change. These two polymorphisms were analyzed using Fluidigm's Biomark system. This technology is designed for the allelic discrimination 5' nuclease assay. The samples and the TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) were prepared and conducted following the manufacturer's instructions. The 48.48 dynamic arrays used were automatically loaded using an integrated fluidic circuit (IFC) controller (Fluidigm Corporation), and real-time reactions were performed and analyzed using a BioMark real-time PCR system and analysis software (Fluidigm Corporation), respectively. As a quality control, normal, heterozygote, and homozygote sequenced samples were included on every array for each genotype.

The 80A \rightarrow G polymorphism (rs1051266) in the RFC1 gene, as well as the two markers (677C \rightarrow T [rs1801133] and 1298A \rightarrow T [rs1801131]) in the MTHFR gene and the 870A \rightarrow G polymorphism (rs9344) in the CCND1 gene, was analyzed using the above-described platform, based on microfluidic dynamic arrays.

Statistical analyses. Data are expressed as medians with interquartile ranges (IQRs) or as otherwise specified. Continuous variables were assessed with a nonparametric analysis of variance by applying a rank transformation on the dependent variable (rank analysis of variance) for more than two groups with the Bonferroni alpha adjustment for *post hoc* comparisons.

Categorical data such as genotype and allele frequencies were compared by use of Fisher's exact test. The level of significance was established at the 0.05 level, and all reported *P* values are two-sided. All analyses were performed with SAS (version 9.1.3) software (SAS Institute Inc., Cary, NC). Stepwise logistic regression analysis was used to examine the association of d4T-TP intracellular levels and other parameters with TS polymorphisms. The variables selected to be entered into stepwise regression were those that correlated significantly with TS polymorphisms (after Bonferroni correction for multiple testing).

RESULTS

Population studied. Thirty-three Caucasian HIV-1-infected patients whose ethnicity was traced back to their grandparents and who were on d4T-based therapy were enrolled. The demographics and viroimmunological status of the population studied are shown in Table 1. There were no diabetic patients. Only two patients (9.1%) were taking sulfonamides at the time of the study, and no one else was taking any other drug except for antiretrovirals.

Distribution of genotypes, anthropometric, fat parameters, and HALS. All 33 patients who fulfilled the inclusion criteria were genotyped. With respect to TS genotypes, there were 15 patients (45.4%) with high-expression genotypes (2/3G, 3C/3G, 3G/3G) and 18 patients (54.5%) with low-expression genotypes (2/2, 2/3C, 3C/3C). The relationship of TS genotypes with demographic, anthropometric, metabolic, and fat data and viroimmunological variables is shown in Table 2, where it

TABLE 1. Demographics and viroimmunological status of the population studied

Parameter*	Value
Median (IQR) age (yr).....	44.0 (41.0–48.0)
No. (%) men.....	27 (81.8)
Mean no. (%) of subjects by source of HIV-1 infection	
MsM (%).....	13 (39.4)
HTSX (%).....	8 (24.2)
IDU (%).....	12 (36.4)
Median (IQR) no. of yr since diagnosis.....	13.0 (10.7–17.7)
No. (%) of subjects with the following characteristics:	
Smoker.....	24 (72.7)
Alcohol abuse.....	1 (6.2)
Prior AIDS.....	13 (39.4)
HCV coinfection.....	11 (33.3)
HBV coinfection.....	3 (9.1)
Median (IQR) no. of cells/mm ³	
CD4 count.....	502 (392–800)
CD4 increase.....	383 (272–690)
CD8 count.....	1,024 (751–1,366)
CD8 increase.....	600 (344–846)
No. (%) of subjects with:	
Nadir CD4 cell count <100 cells/mm ³	15 (45.4)
Nadir CD4 cell count <200 cells/mm ³	21 (63.6)
Median (IQR) log ₁₀ viral load (no. of copies/ml).....	1.28 (1.28–1.28)
No. (%) of subjects with maximum viral load of ≥5 log ₁₀ copies/ml.....	15 (45.4)
Median (IQR) viral load decrease (log ₁₀ no. of copies/ml).....	-3.38 (-2.49 to -4.01)

* MsM, men who have sex with men; HTSX, heterosexual; IDU, intravenous drug users; HCV, hepatitis C virus; HBV, hepatitis B virus; CD4 and CD8 increase, current CD4/CD8 counts minus CD4/CD8 counts prior to starting of antiretroviral therapy.

is apparent that low-expression TS genotypes were associated with decreased appendicular fat ($P = 0.0344$) and with the presence of HALS (odds ratio [OR] = 14.0; 95% confidence interval [CI] = 2.09 to 108.0; $P = 0.0032$). Table 3 shows the frequencies of the 2, 3C, and 3G alleles of TS; MTHFR 677C → T and 1298A → T; DHFR 19-bp ins/del, 317A → G, 680C → A, and 1610C → G; RFC1 80A → G; and CCND1 370A → G.

Antiretroviral drug exposure and immunovirological situation. Most of the patients ($n = 28$, 84.8%) had undetectable viral loads at the time of the study. The median plasma viral load in the five patients in whom it was detectable was 215 copies/ml (range, 109 to 473 copies/ml). The median CD4 count was 502 cells/mm³ (IQR, 392 to 800 cells/mm³). The nadir CD4 cell count was <200 cells/mm³ in 21 patients (63.4%). The cumulated exposure to antiretroviral drugs related to TS genotype is shown in Table 4.

Intracellular concentrations of d4T-TP and genotypes. The mean d4T-TP concentrations were 20.48 ± 15.54 fmol/10⁶ cells (median, 17.0 fmol/10⁶ cells [IQR = 12.02 to 23.50 fmol/10⁶

cells]). The mean concentrations of d4T-TP for patients with the different genotypes are shown in Table 3, where it is apparent that only the TS genotype individually influenced the levels of intracellular d4T-TP in a statistically significant way. To analyze the relative contribution of other polymorphisms to the increase in d4T-TP intracellular levels in the setting of low-expression TS, an individual analysis of each of them was done, with the following results: MTHFR 677C → T, $P > 0.1$; MTHFR 1298A → C, $P = 0.0294$; DHFR 19-bp ins/del, $P > 0.1$; DHFR 317A → G, $P > 0.1$; DHFR 680C → A, $P > 0.1$; DHFR 1610C → G, $P > 0.1$; RFC1 80A → G, $P > 0.1$; and CCND1 870A → G, $P > 0.1$. When the same polymorphisms were analyzed in the setting of low-expression TS, we did not find a statistically significant difference in d4T-TP intracellular concentrations for any one of them. An exploratory stepwise logistic regression analysis took d4T-TP intracellular levels as the dependent variable (≤ 17 or > 17 fmol/10⁶ cells/liter) and included all variables associated with a P value of <0.1 in the univariate analysis. The independent associated factors were polymorphism of TS (low versus high expression; OR = 86.22; 95% CI = 8.48 to nonestimable; $P = 0.0023$) and increase in CD4 lymphocytes ($\times 100$ cells/mm³; OR = 0.58; 95% CI = 0.29 to 0.92; $P = 0.0514$).

DISCUSSION

Pharmacogenetics is of recent application to the field of antiretroviral therapy. A number of polymorphisms in genes modifying drug metabolism and eventually the toxic profile have been described so far, including the CYP2B6 516G → T and CYP2B6 983T → C polymorphisms, which have been shown to influence efavirenz and nevirapine plasma levels (21, 42, 48); an A(TA)_nTAA polymorphism of UGT1A1 for unconjugated hyperbilirubinemia, which has been found to be associated with indinavir and atazanavir (43); and CYP2C19 681G → A for nelfinavir plasma exposure (22). Additionally, a tumor necrosis factor alpha position 238G → A variant allele has been associated with HALS development (33). To date, however, the most successful translation of pharmacogenetics into the clinic has been the association of carriage of HLA*B5701 with hypersensitivity to abacavir (39).

Our study shows that the functional polymorphisms of the gene encoding TS may have implications when the patient receives antiretroviral therapy that includes d4T. These polymorphisms may cause substantial and significant variations in the intracellular concentration of d4T-TP, which is the important active pharmacological (and toxic) moiety of d4T since it inhibits both HIV-1 reverse transcriptase (15) and mammalian DNA polymerase γ (28). We have also found that different polymorphisms in the genes encoding MTHFR, DHFR, RFC1, and CCND1 have no significant impact on intracellular d4T-TP levels. However, our findings should be viewed in light of the inherent limitations of the study because we did not measure TS mRNA levels, nor did we measure the enzymatic activities of TS and TK1 or TTP levels.

TS is a key enzyme in the nucleotide biosynthetic pathway that methylates dUMP to produce dTMP, and the TS reaction is the sole *de novo* source of thymidylate in the cell and is essential for DNA replication (24), although the pyrimidine salvage pathway, through TK1 and TK2, also contributes by

TABLE 2. Relationship of demographic, anthropometric, metabolic, and fat data with TS genotype

Characteristic*	Value by TS expression group		P value
	High (n = 15)	Low (n = 18)	
Age (yr)	45.0 (43.0–48.7)	44.0 (41.0–47.0)	>0.1
No. (%) male	12 (80.0)	15 (83.3)	>0.1
Wt (kg)	72.0 (57.6–78.2)	64.5 (57.0–75.0)	>0.1
No. (%) with AIDS	3 (20.0)	10 (55.5)	0.0724
No. (%) with HBV infection	2 (13.3)	1 (5.5)	>0.1
No. (%) with HCV infection	4 (26.7)	7 (38.9)	>0.1
BMI	22.90 (20.70–25.84)	22.22 (19.90–25.47)	>0.1
No. of yr of infection	13.0 (12.0–19.2)	13.0 (10.0–17.0)	>0.1
Waist circumference (cm)	88.0 (80.0–98.0)	90.5 (81.0–95.0)	>0.1
WHR	0.93 (0.90–0.98)	0.94 (0.92–1.00)	>0.1
LSGS score	2.5 (0.0–7.6)	7.5 (2.00–11.0)	0.0713
Facial lipoatrophy score	0 (0.0–2.0)	2.0 (1.0–2.0)	0.0362
Fat percentage	20.21 (15.47–23.87)	18.93 (16.07–22.20)	>0.1
No. (%) with HALS	3 (17.6)	14 (82.3)	0.0016
Systolic BP (mm Hg)	120 (112–131)	120 (110–130)	>0.1
Diastolic BP (mm Hg)	75 (72–80)	74.5 (70–80)	>0.1
Whole-body fat (g)	11,580 (10,220–16,341)	11,260 (10,019–11,880)	>0.1
Trunkal fat (g)	9,265 (6,245–10,863)	8,696 (5,310–10,162)	>0.1
Left leg fat (g)	1,012 (768–1,922)	912 (642–1,131)	>0.1
Appendicular fat (g)	3,534 (3,042–5,056)	3,008 (2,407–3,413)	0.0344
Trunk/appendicular fat ratio	2.237 (1.460–2.833)	2.816 (2.077–3.399)	>0.1
No. (%) with metabolic syndrome	9 (60.0)	8 (47.1)	>0.1
Concn (mmol/liter)			
Total cholesterol	4.96 (3.96–5.91)	5.47 (3.87–6.19)	>0.1
Triglycerides	2.15 (1.53–2.26)	1.78 (1.40–2.75)	>0.1
HDL cholesterol	1.15 (0.89–1.53)	1.13 (0.94–1.42)	>0.1
LDL cholesterol	2.46 (2.11–3.22)	2.98 (1.90–4.15)	>0.1
VLDL cholesterol	0.99 (0.71–1.04)	0.81 (0.66–1.07)	>0.1
Fasting glucose	5.30 (4.87–5.67)	5.50 (4.80–6.00)	>0.1
Fasting insulin concn (pmol/liter)	52.0 (34.7–80.0)	64.0 (27.0–123.0)	>0.1
HOMA-IR	1.00 (0.70–1.50)	1.35 (0.90–2.40)	>0.1
CD4 increase (cells/mm ³)	439 (283–664)	381 (154–723)	>0.1
CD8 increase (cells/mm ³)	638 (477–856)	522 (341–803)	>0.1
Viral load decrease (log ₁₀ copies/ml)	3.38 (2.66–4.02)	3.39 (2.49–4.31)	>0.1

* Values are expressed as medians (interquartile ranges) unless specified otherwise. HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; WHR, waist-hip ratio; VLDL, very low-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment-insulin resistance; LSGS, lipodystrophy severity grading scale; BP, blood pressure.

recycling deoxythymidine from the cell turnover or diet (32). The variability in TS expression can be related to a VNTR polymorphism in the TS promoter region. A common G → C SNP in the second repeat of the alleles containing three repeats has recently been described; thus, the combination of an SNP and a VNTR allows the definition of different TS alleles showing different patterns of gene expression. We found that polymorphisms of TS linked to low expression of the enzyme are associated with increased d4T-TP levels, which may have consequences in terms of toxicity, since as a thymidylate analogue, d4T-TP is a competitive inhibitor with dTTP for polymerase γ (30). A key step in the pathophysiology of NRTI pharmacology and toxicity is regulation of natural deoxyribonucleotide pool sizes in mitochondria that affect mitochondrial DNA (mtDNA) replication (1). On the contrary, dysregulation of phosphorylation and dephosphorylation could impact mtDNA replication (32). TS genotypes associated with reduced enzyme activity would be expected to increase the competitive advantage of d4T-TP with the endogenous (lowered) dTTP pools, provided there are no expression changes in the salvage pathway of TK1 or TK2 (3). Moreover, decreased dTTP pools will stimulate thymidine kinase activity due to alleviation of the feedback inhibition by the end product of this

metabolic pathway, dTTP (6). This may lead to a pronounced increase of the intracellular ratio of NRTI triphosphate/dTTP. Once it is formed, the active NRTI triphosphate competes with its corresponding natural endogenous 2'-deoxynucleoside triphosphate (dNTP) for incorporation by the viral reverse transcriptase or host DNA polymerases, causing suppression of viral replication or toxicity (46). Therefore, due to the competitive nature of their incorporation by polymerases, changes in the levels of either NRTI triphosphate, such as those described in the present work, could then alter the activity and toxicity of NRTIs. There is pharmacological evidence that agents that inhibit *de novo* pyrimidine nucleotide biosynthesis have the ability to increase d4T phosphorylation (18). Hydroxyurea, a ribonucleotide reductase inhibitor that also acts by lowering the dTTP pools, may afford similar effects on d4T phosphorylation (17). Interestingly, a combination of hydroxyurea with d4T has been associated with excess toxicity, especially pancreatitis and peripheral neuropathy, in different studies (44).

There is overwhelming epidemiological evidence linking d4T to the development of fat depot alterations (47). In this regard, our preliminary work, which needs further replication, suggests that a genetic mechanism may cause an alteration of nucleotide pools favoring an increase in d4T-TP levels, which

TABLE 3. Frequency and relationship of TS, MTHFR, DHFR, RFC1, and CCND1 genotypes with d4T-TP intracellular levels

Genotype	d4T-TP concn (fmol/10 ⁶ cells)	P value ^a
TS		
2R/2R (n = 4)	24.55 (18.80–29.10) ^b	0.0001
2R/3C (n = 9)	22.50 (19.35–39.50)	
2R/3G (n = 7)	10.10 (8.12–13.40)	
3C/3C (n = 5)	20.10 (17.67–22.25)	
3C/3G (n = 6)	11.20 (7.60–13.90)	
3G/3G (n = 2)	17.0 (13.10–20.90)	
Low expression (n = 18)	21.40 (18.90–27.0)	<0.0001
High expression (n = 15)	11.50 (8.12–13.87)	
MTHFR 677C → T		
C/C (n = 10)	15.40 (10.50–26.50)	>0.1
C/T (n = 19)	19.40 (14.20–21.90)	
T/T (n = 4)	12.30 (8.20–19.90)	
MTHFR 1298A → C		
A/A (n = 11)	13.10 (8.22–20.55)	0.0294
A/C (n = 19)	17.00 (13.82–22.10)	
C/C (n = 3)	28.50 (27.0–29.40)	
DHFR 19-bp ins/del		
ins/ins (n = 11)	15.20 (10.85–20.67)	>0.1
ins/del (n = 19)	17.00 (11.67–26.80)	
del/del (n = 3)	22.10 (15.95–60.27)	
DHFR 317A → G		
A/A (n = 10)	17.65 (10.10–20.70)	>0.1
A/G (n = 20)	15.90 (11.85–26.70)	
G/G (n = 3)	22.10 (15.95–60.27)	
DHFR 680C → A		
A/A (n = 9)	22.10 (13.87–27.67)	>0.1
A/C (n = 7)	19.40 (12.85–25.35)	
C/C (n = 17)	14.80 (10.00–20.22)	
DHFR 1610C → G		
C/C (n = 12)	17.10 (10.95–22.30)	>0.1
C/G (n = 10)	18.05 (13.10–27.0)	
G/G (n = 3)	20.65 (20.60–20.70)	
C/T (n = 4)	14.00 (9.85–39.62)	
G/T (n = 4)	15.90 (11.20–17.95)	
RFC1 80A → G		
A/A (n = 9)	14.00 (9.17–22.25)	>0.1
A/G (n = 16)	14.80 (11.85–21.70)	
G/G (n = 8)	21.35 (18.20–27.75)	
CCND1 870A → G		
A/A (n = 4)	10.30 (7.50–15.50)	>0.1
A/G (n = 21)	19.40 (13.62–26.55)	
G/G (n = 8)	15.00 (13.05–23.80)	

^a Statistically significant pairwise comparisons after Bonferroni's adjustment: 2/2 versus 2/3G, 2/2 versus 3C/3G, 2/3C versus 2/3G, 2/3C versus 3C/3G, 2/3G versus 2/2, 2/3G versus 2/3C, 2/3G versus 3C/3C, 3C/3C versus 2/3G, 3C/3G versus 2/2, and 3C/3G versus 2/3C.

^b Data in parentheses represent IQRs.

we have found to be associated with the development of HALS in two different studies (11). This may explain why the TS genotype is also associated with the development of HALS (Table 2). In addition, this mechanism may also explain the different impact of d4T toxicity on fat depots in different individuals, depending on their genetic background.

The different genotypes of the VNTR in the TS promoter region (2/2, 2/3, and 3/3) occur at different frequencies in different populations. In Caucasians, heterozygosity occurs in approximately 50% of the population, and each of the two homozygous genotypes is found in approximately 25% of the

TABLE 4. Antiretroviral drug exposure and TS genotype in the population studied^a

Parameter	Value by TS expression group		P value
	High (n = 15)	Low (n = 18)	
Current ART composition			>0.1
PI based	9 (60.0)	7 (38.9)	
NNRTI-based	2 (13.3)	5 (27.8)	
Three NRTIs	4 (26.7)	4 (22.2)	
IP + NNRTI	0 (0)	2 (11.1)	
Current NRTI backbone			>0.1
d4T + 3TC	7 (46.7)	11 (61.1)	
d4T + TDF	7 (46.7)	4 (22.2)	
d4T + ddI	1 (6.7)	3 (16.7)	
HAART duration (mo)	130 (97–159)	109 (84–121)	>0.1
Cumulated individual drug exposure			
AZT exposure (mo)	0.0 (0–20)	0 (0–24)	>0.1
AZT exposure (g)	0.0 (0–572)	0 (0–360)	>0.1
d4T exposure (mo)	117 (90–129)	103 (65–120)	>0.1
d4T exposure (g)	199 (157–297)	178 (99–216)	>0.1
d4T doses (mg/kg)	1.03 (0.92–1.10)	0.96 (0.81–1.09)	>0.1
3TC exposure (mo)	72 (39–108)	42 (12–89)	>0.1
ddI exposure (mo)	216 (160–256)	151.2 (131.4)	0.0706
ddC exposure (mo)	0 (0–7.5)	0 (0–0)	>0.1
ABC exposure (mo)	0 (0–4.5)	0 (0–5)	>0.1
TDF exposure (mo)	0 (0–0)	0 (0–4)	>0.1
EFV exposure (mo)	13.0 (0–48)	5 (0–45)	>0.1
NVP exposure (mo)	0 (0–19)	0 (0–8)	>0.1
PI exposure (mo)	60.0 (39–100)	78 (37–120)	>0.1
NRTI exposure (mo)	132 (120–157)	121 (89–133)	>0.1

^a The values of all parameters are expressed as medians (interquartile ranges). ART, antiretroviral therapy; PI, protease inhibitor; NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor; AZT, zidovudine; d4T, stavudine; 3TC, lamivudine; ddI, didanosine; ddC, zalcitabine; ABC, abacavir; TDF, tenofovir; EFV, efavirenz; NVP, nevirapine.

population. The same is true for black people and for south-west Asians (35). However, subjects with homozygous triple repeats were twice as common among Chinese subjects (67%) as among Caucasian subjects (38%) (35). This may explain why HALS, a toxicity that has been directly linked to thymidine analogues, which have been widely used all over the world, has been so rarely reported in Far East Asian countries (8).

MTHFR catalyzes an irreversible conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate. The former is essential to DNA synthesis by acting as a cofactor in the conversion of dUMP to dTMP by TS (10). Polymorphisms in the MTHFR gene may influence intracellular folate pools, and thus, TS activity can be modified. So far, two functional MTHFR polymorphisms, 677C → T and 1298A → C, have been recognized, and both of these are associated with decreased enzymatic activity (14, 49). We have examined both polymorphisms, and neither of them individually determined significant changes in intracellular levels of d4T-TP.

Other enzymes that are implicated in folate metabolism and that consequently have a potential impact on TS functionalism are DHFR and RFC1. DHFR is primarily involved in the reduction of dihydrofolate, generated during thymidylate synthesis, to tetrahydrofolate in order to maintain adequate amounts of folate for DNA synthesis and homocysteine remethylation (19). There are a number of polymorphisms of DHFR described. Similar to MTHFR polymorphisms, none of them significantly modified intracellular d4T-TP levels. RFC1 is an essential fo-

late transporter and functions as a bidirectional anion exchanger, taking up folate cofactors and exporting various organic anions. An 80G → A polymorphism in the RFC1 gene has been shown to be associated with alterations in folate and homocysteine metabolism in healthy individuals (9). We found that this genetic variation did not induce substantial modifications in d4T-TP intracellular levels.

We also considered the involvement of a biological system that regulates the availability in the cell of two transcription factors (DP-1 and E2F-1) that increase the transcription of, among others, the TS, DHFR, and thymidine kinase genes: one of the members of the cyclin family, CCND1, along with cyclin-dependent kinases, phosphorylates and inactivates the retinoblastoma protein and promotes progression through the G₁-S phase of the cell cycle. During this process the two mentioned transcription factors are released in the cell. We found that the G → A polymorphism at nucleotide 870 in the CCND1 gene, which may modulate expression of the cyclin D1 protein, did not affect the d4T-TP intracellular levels.

The present cross-sectional study, which includes a limited number of patients, has shown a significant, although preliminary, association between the genotype of the TS gene and d4T-TP intracellular levels in HIV-1-infected patients treated with a d4T-based antiretroviral regime. To our knowledge, this is the first pharmacogenetic study that has demonstrated the involvement of the metabolic folate pathway in determining the levels of d4T-TP, which in turn have been associated with the appearance of HALS (11). Not unexpectedly, TS genotypes are also associated with the appearance of HALS as well.

Pharmacogenetics, and especially toxicogenetics, is becoming an increasingly important field in the study of antiretroviral therapy for HIV-1 infection. Genetic factors can alter drug metabolism and activity and can predict drug toxicity and/or efficacy. Therefore, determination of polymorphisms in xenobiotic-metabolizing enzymes before the administration of antiretroviral therapy could offer new strategies for optimizing the therapy of individual patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 02/1280, 05/1591, 07/0976, EC08/00256), the Fundación para la Prevención del SIDA en España (FIPSE 36610, 36572/06), and the Red de Investigación en SIDA (RIS RD06/006/0022, RD06/0006/1004).

We declare that we do not have any conflict of interest.

REFERENCES

- Anderson, P. L., T. N. Kakada, and K. A. Lichtenstein. 2004. The cellular pharmacology of nucleoside- and nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors and its relationship to clinical toxicities. *Clin. Infect. Dis.* 38:743-753.
- Ascaso, J. F., et al. 2003. Abdominal obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome in a southern European population. *Eur. J. Intern. Med.* 14:101-106.
- Batzarini, J. 2000. Effect of antimetabolic drugs of nucleotide metabolism on the anti-human immunodeficiency virus activity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 87:175-187.
- Benech, H., et al. 2004. Peripheral blood mononuclear cell counting using a DNA-detection-based method. *Anal. Biochem.* 338:172-174.
- Betticher, D. C., et al. 1995. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* 11:1005-1011.
- Bresnick, E., and R. Karjala. 1964. End product inhibition of thymidine kinase activity in normal and leukemic leukocytes. *Cancer Res.* 24:841-846.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1993. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance for case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm. Rep.* 41(RR-17):1-13.
- Chang, K. H., J. M. Kim, Y. G. Song, H. C. Lee, and S. K. Lim. 2002. Does race protect an Oriental population from developing lipodystrophy in HIV-infected individuals on HAART? *J. Infect.* 44:33-38.
- Chango, A., et al. 2000. A polymorphism (80G → A) in the reduced folate carrier gene and its association with folate status and homocysteinemia. *Mol. Genet. Metab.* 70:310-315.
- De Maizia, E., and G. Toffoli. 2009. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *Eur. J. Cancer* 45:1333-1351.
- Domingo, P., et al. 2010. Relationship between HIV/highly active antiretroviral therapy (HAART)-associated lipodystrophy syndrome and stavudine triphosphate intracellular levels in patients with stavudine-based antiretroviral regimens. *Clin. Infect. Dis.* 50:1033-1040.
- Dulucq, S., et al. 2008. DNA variants in dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood* 111:3692-3700.
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. 2001. 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* 285:2486-2497.
- Probst, P., et al. 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* 10:111-113.
- Furman, P. A., et al. 1986. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83:8333-8337.
- Gallant, J. E., et al. 2006. Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. *N. Engl. J. Med.* 354:251-260.
- Gao, W. Y., D. G. Johns, and H. Mitsuya. 1994. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of hydroxyurea in combination with 29,39-dideoxynucleosides. *Mol. Pharmacol.* 46:767-772.
- Gao, W. Y., D. G. Johns, M. Tanaka, and H. Mitsuya. 1999. Suppression of replication of multidrug-resistant HIV type 1 variants by combinations of thymidylate synthase inhibitors with zidovudine or stavudine. *Mol. Pharmacol.* 55:535-540.
- Gellekink, H., H. J. Blom, I. J. van der Linden, and M. den Heijer. 2007. Molecular genetic analysis of the human dihydrofolate reductase gene: relation with plasma total homocysteine, serum and red blood cell folate levels. *Eur. J. Hum. Genet.* 15:103-109.
- Grundy, S. M., et al. 2005. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: a American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation* 112:2735-2752.
- Haas, D. W., et al. 2004. Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. *AIDS* 18:2391-2400.
- Haas, D. W., et al. 2005. Pharmacogenetics of long-term responses to antiretroviral regimens containing efavirenz and/or nevirapine: an adult AIDS Clinical Trials Group Study. *J. Infect. Dis.* 192:1931-1942.
- Hainline, A., J. Karon, and K. Lippel (ed.). 2000. Manual of laboratory operations, lipids and lipoprotein analysis, 2nd ed. Lipid Research Clinic Program, National Heart, Lung and Blood Institute, Bethesda, MD.
- Horie, N., H. Alba, K. Oguro, H. Hojo, and K. Taketshi. 1995. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct. Funct.* 26:191-197.
- Kawakami, K., et al. 2001. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin. Cancer Res.* 7:4096-4101.
- Kawakami, K., and G. Watanabe. 2003. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res.* 63:6004-6007.
- Lemieux, S., D. Prud'homme, C. Bouchard, A. Tremblay, and J. P. Despres. 1996. A single threshold of waist girth identifies normal-weight and overweight subjects with excess visceral adipose tissue. *Am. J. Clin. Nutr.* 64:685-693.
- Lewis, W., and M. C. Dalakas. 1995. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nat. Med.* 1:417-422.
- Lewis, W., B. J. Day, and W. C. Copeland. 2003. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:812-822.
- Lewis, W., J. F. Simpson, and R. R. Meyer. 1994. Cardiac mitochondrial DNA polymerase-gamma is inhibited competitively and noncompetitively by phosphorylated zidovudine. *Circ. Res.* 74:344-348.
- Lichtenstein, K. A. 2005. Redefining lipodystrophy syndrome: risks and impact on clinical decision making. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 39:395-400.
- Löffler, M., L. D. Fairbanks, E. Zamiat, A. M. Martynki, and H. A. Simmonds. 2005. Pyrimidine pathways in health and disease. *Trends Mol. Med.* 11:430-437.
- Maher, B., et al. 2002. TNF-alpha promoter region gene polymorphisms in HIV-positive patients with lipodystrophy. *AIDS* 16:2013-2018.

34. Mandola, M. V., et al. 2003. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res.* 63:2896-2904.
35. Marsh, S., E. S. R. Collie-Duguid, T. Li, X. Liu, and H. L. McLeod. 1999. Ethnic variation of the thymidylate enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics* 58:310-312.
36. Matthews, D. R., J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, and R. C. Turner. 1985. Homeostasis model assessment. *Diabetologia* 28:412-419.
37. Miller, J., et al. 2003. HIV lipodystrophy: prevalence, severity and correlates of risk in Australia. *HIV Med.* 4:293-301.
38. Miller, S. A., D. D. Dykes, and H. F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215.
39. Phillips, E., and S. Mallat. 2009. Successful translation of pharmacogenetics into the clinic: the abacavir example. *Mol. Diagn. Ther.* 13:1-9.
40. Pruvost, A., et al. 2001. Direct determination of phosphorylated intracellular anabolites of stavudine (d4T) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 15:1401-1408.
41. Pruvost, A., F. Théodoro, L. Agrofoglio, E. Negrodo, and H. Bénéch. 2008. Specificity enhancement with LC-positive ESI-MS/MS for the measurement of nucleotides: application to the quantitative determination of carbonyl triphosphate, lamivudine triphosphate and tenofovir diphosphate in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Mass Spectrom.* 43:224-233.
42. Rouger, M., et al. 2005. Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. *Pharmacogenet. Genomics* 15:1-5.
43. Rouger, M., et al. 2005. Gilbert syndrome and the development of antiretroviral therapy-associated hyperbilirubinemia. *J. Infect. Dis.* 192:1381-1386.
44. Rutschmann, O. T., et al. 2000. Long-term hydroxyurea in combination with didanosine and stavudine for the treatment of HIV-1 infection. *Swiss HIV Cohort Study. AIDS* 14:2145-2151.
45. Sugtuch, H., Y. Uji, and K. Okabe. 1995. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulphated alpha-cyclodextrin. *Clin. Chem.* 41:717-723.
46. Vela, J. E., M. D. Miller, G. R. Rhodes, and A. S. Ray. 2008. Effect of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitors of HIV on endogenous nucleotide pools. *Antivir. Ther.* 13:789-797.
47. Villarroya, F., P. Domingo, and M. Giralt. 2005. Lipodystrophy associated with highly active antiretroviral therapy for HIV infection: the adipocyte as a target of antiretroviral-induced mitochondrial toxicity. *Trends Pharmacol. Sci.* 26:88-93.
48. Wang, J., et al. 2006. Identification of a novel specific CYP2B6 allele in Africans causing impaired metabolism of the HIV drug efavirenz. *Pharmacogenet. Genomics* 16:191-198.
49. Weisberg, L. P., Tran, B., Christensen, S. Sibani, and R. Rozen. 1998. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol. Genet. Metab.* 64:169-172.

3. Artículo III

ASSOCIATION OF THYMIDYLATE SYNTHASE POLYMORPHISMS WITH ACUTE PANCREATITIS AND/OR PERIPHERAL NEUROPATHY IN HIV-INFECTED PATIENTS ON STAVUDINE –BASED THERAPY.

Domingo P, Cabeza M del C, Torres F, Salazar J, Gutierrez M del M, Mateo MG, Martínez E, Domingo JC, Fernández I, Villarroya F, Ribera E, Vidal F, Baiget M.

PLoS One. 2013;8(2):e57347. doi: 10.1371/journal.pone.0057347. Epub 2013 Feb 28.

RESUMEN:

ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LA TIMIDILATO SINTASA CON LA PANCREATITIS AGUDA Y/O NEUROPATÍA PERIFÉRICA EN PACIENTES CON LA INFECCIÓN POR VIH CON TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL BASADO EN ESTAVUDINA.

La neuropatía periférica es una de las manifestaciones de la toxicidad mitocondrial del tratamiento antirretroviral basado en análogos de la timidina más frecuente. La pancreatitis aguda asociada al TARGA es un efecto grave y potencialmente mortal. Partiendo de trabajos previos donde se ha demostrado que los polimorfismos de baja expresión de la TS se asocian al síndrome de lipodistrofia en pacientes con la infección por VIH en tratamiento antirretroviral, llevamos a cabo un estudio de casos y controles para probar la hipótesis de que otras manifestaciones de la toxicidad mitocondrial como la neuropatía periférica y la pancreatitis aguda también se encuentran relacionadas con dichos polimorfismos.

Los pacientes expuestos al d4T presentaban una incidencia global de pancreatitis y/o neuropatía periférica asociada al d4T de 19.05 casos por 1000 pacientes-año (PA) frente al 4.28 en aquellos no expuestos ($p < 0.0001$). El genotipo de TS más frecuentes en pacientes con manifestaciones de toxicidad mitocondrial fue el genotipo de baja expresión, 712.1% en pacientes frente un 46.5% en controles ($p < 0.0062$). En el análisis multivariante, los factores asociados con menor probabilidad de aparición de la pancreatitis y de la neuropatía periférica fueron la cifra de CD4 nadir > 200 céls/mm³ (OR=0.39, IC 95%:0.18-0.87; $p=0.022$) y la presencia de síndrome de lipodistrofia (OR=0.40, IC95% 0.19-0.86; $p=0.018$). El único factor asociado con mayor probabilidad

de desarrollo de pancreatitis y/o neuropatía fue el genotipo de TS de baja expresión (OR=3.39, IC95% 1.60-7.81; p=0.002).

Association of Thymidylate Synthase Polymorphisms with Acute Pancreatitis and/or Peripheral Neuropathy in HIV-Infected Patients on Stavudine-Based Therapy

Pere Domingo^{1*}, Maria del Carmen Cabeza^{1,3}, Ferran Torres², Juliana Salazar³, Maria del Mar Gutierrez¹, Maria Gracia Mateo¹, Esteban Martínez⁴, Joan Carles Domingo⁵, Irene Fernandez¹, Francesc Villarroya⁵, Esteban Ribera⁶, Francesc Vidal⁷, Montserrat Baiget⁸

1 Infectious Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Biostatistics and Data Management Platform, IDIBAPS, Hospital Clínic; Biostatistics Unit, School of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **3** CIBERER (U-705), Barcelona, Spain, **4** Infectious Diseases Service, Hospital Clínic Universitari, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **5** Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **6** Infectious Diseases Service, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **7** Hospital Universitari Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain, **8** Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

Background: Low expression thymidylate synthase (TS) polymorphism has been associated with increased stavudine triphosphate intracellular (d4T-TP) levels and the lipodystrophy syndrome. The use of d4T has been associated with acute pancreatitis and peripheral neuropathy. However, no relationship has ever been proved between TS polymorphisms and pancreatitis and/or peripheral neuropathy.

Methods: We performed a case-control study to assess the relationship of TS and methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms with acute pancreatitis and/or peripheral neuropathy in patients exposed to d4T. Student's t test, Pearson's correlations, one-way ANOVA with Bonferroni correction and stepwise logistic regression analyses were done.

Results: Forty-three cases and 129 controls were studied. Eight patients (18.6%) had acute pancreatitis, and 35 (81.4%) had peripheral neuropathy. Prior AIDS was more frequent in cases than in controls (OR = 2.36; 95%CI 1.10–5.07, P = 0.0247). Low expression TS and MTHFR genotype associated with increased activity were more frequent in patients with acute pancreatitis and/or peripheral neuropathy than in controls (72.1% vs. 46.5%, OR = 2.97; 95%CI: 1.33–6.90, P = 0.0062, and 79.1% vs. 56.6%, OR = 2.90, 95%CI: 1.23–7.41, P = 0.0142, respectively). Independent positive or negative predictors for the development of d4T-associated pancreatitis and/or peripheral neuropathy were: combined TS and MTHFR genotypes (reference: A+A; P = 0.002; OR_{A+B} = 0.34 [95%CI: 0.08 to 1.44], OR_{B+A} = 3.38 [95%CI: 1.33 to 8.57], OR_{B+B} = 1.13 [95%CI: 0.34 to 3.71]), nadir CD4 cell count >200 cells/mm³ (OR = 0.38; 95%CI: 0.17–0.86, P = 0.021), and HALS (OR = 0.39 95%CI: 0.18–0.85, P = 0.018).

Conclusions: Low expression TS plus a MTHFR genotype associated with increased activity is associated with the development of peripheral neuropathy in d4T-exposed patients.

Citation: Domingo P, Cabeza MdC, Torres F, Salazar J, Gutierrez MdM, et al. (2013) Association of Thymidylate Synthase Polymorphisms with Acute Pancreatitis and/or Peripheral Neuropathy in HIV-Infected Patients on Stavudine-Based Therapy. PLoS ONE 8(2): e57347. doi:10.1371/journal.pone.0057347

Editor: Rui Medeiros, IPO, Inst Port Oncology, Portugal

Received: October 9, 2012; **Accepted:** January 21, 2013; **Published:** February 28, 2013

Copyright: © 2013 Domingo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work has been partially funded by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 02/1280, 05/1591, 07/0976, 08/00256), Fundación para la Prevención del SIDA en España (FIPSE 36610, 36572/06), and Red de Investigación en SIDA (RIS RD06/006/0022). Pere Domingo is supported by Programa de Intensificación de Investigadores del Instituto de Salud Carlos III (INT12/383). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pdomingo@santpau.cat

These authors contributed equally to this work.

Introduction

The doubtless efficacy of highly active antiretroviral therapy (HAART) is still shadowed by drug toxicity, specially that appearing in the long-term [1]. Some of the most important toxic effects experienced by patients on HAART are caused by the nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) part of the regime [2]. Among NRTI-associated toxicity, that caused by

thymidine analogues, namely zidovudine (AZT) and stavudine (d4T) stands out. The common mechanism underlying thymidine analogues' toxic effects is mitochondrial toxicity [3]. The ability of the triphosphate active NRTI to inhibit mitochondrial gamma polymerase causes mitochondrial DNA depletion that may eventually lead to mitochondrial respiratory chain protein de-

pletion which in turn leads to mitochondrial dysfunction [4]. This can ultimately cause cellular dysfunction or even cellular death [5].

The ability of thymidine analogues to inhibit mitochondrial gamma polymerase will depend on the intracellular concentrations of their triphosphate metabolites [6]. Therefore, all the circumstances increasing the levels of these metabolites may be accompanied by a higher degree of mitochondrial toxicity [7]. We recently described how thymidylate synthase (TS) polymorphisms may modify d4T triphosphate (d4T-TP) intracellular concentrations, and how higher intracellular levels of d4T-TP are associated with the HIV/HAART-associated hypodystrophy syndrome (HALS) [7,8].

Our working hypothesis was that TS and MTHFR polymorphisms could be associated with other manifestations of mitochondrial toxicity, such as d4T-associated pancreatitis and d4T-associated peripheral neuropathy. To test this hypothesis we performed a case-control study in d4T-exposed patients who developed pancreatitis or peripheral neuropathy while on d4T-based therapy.

Patients and Methods

Population Studied

All patients and controls were recruited at the same HIV-1 infection clinic at the *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*, which attended a population of 3355 HIV-1-infected patients between 1994 and 2010. All were patients on active follow up with an established diagnosis of HIV-1 infection on d4T-based antiretroviral therapy. Patients were eligible if they had developed pancreatitis and/or peripheral neuropathy while receiving therapy with d4T as part of their antiretroviral regimens. Controls were subjects followed in the same cohort who did not develop pancreatitis and/or neuropathy while on d4T therapy. Controls were selected in a 3:1 ratio with respect to cases. They were matched to patients with respect to age (± 5 years), sex, and exposure to d4T (but not time on d4T). A normal dose of d4T was 40 mg twice daily if the patient weighed >60 kg, and 30 mg twice daily if the patient weighed <60 kg, whereas a reduced dose was 30 mg/12 h and 20 mg/12 h for patients with a weight of ≥ 60 or <60 kg, respectively. Subjects who were hospitalized or had a frank cognitive impairment such as delirium or dementia on enrolment were not eligible. Patients with opportunistic infections, neoplasms or fever of undetermined origin were excluded from the study too. Written informed consent was obtained from the patients at study entry. The study was approved by the Ethics Committee of the *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*.

Definition of Clinical Endpoints

A case of acute pancreatitis was defined as a clinical history consistent with pancreatitis (i.e. abdominal pain with or without findings of shock and hypotension where other causes of abdominal pain have been excluded) with supporting biochemical evidence of pancreatitis: elevated lipase (3 times the upper normal limit) or amylase (3 times the upper normal limit) and evidence of pancreatitis from radiological investigation or hemorrhagic pancreatitis at laparotomy or post-mortem exam [9,10]. Asymptomatic elevations of pancreatic enzymes were not considered to be cases of acute pancreatitis. Chronic pancreatitis cases were excluded from the study.

The diagnosis of neuropathy (sensory or mixed) required the presence of numbness, paresthesias, or dysesthesias in the patient's lower or lower and upper extremities with onset after starting a d4T-based antiretroviral regime [11,12]. A confirmatory electromyogram or a nerve conduction analysis was not a com-

pulsory criterion for the diagnosis of neuropathy. The diagnosis of AIDS was based on the 1993 revised case definition of the Centers for Disease Control and Prevention [13].

The presence or absence of lipoatrophy, lipohypertrophy, and mixed syndrome was determined as previously described [7]. The metabolic syndrome was defined according to the U.S. National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III Guidelines [14] and modified as recommended in the latest American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement [15]. Alcohol abuse was defined when alcohol intake was >40 g daily [16].

Biochemistry Laboratory Measurements

All laboratory investigations were performed after a 12 h overnight fast and at least 15 minutes after the placement of a peripheral intravenous catheter, as previously described [7,8].

Genotyping Analyses

The genomic DNA was extracted from the peripheral leucocytes by the salting-out procedure [17]. In the TS gene, the variable number tandem repeat (VNTR) of 28 bp polymorphism and the G \rightarrow C SNP in the first and second repeat were analyzed. A DNA fragment was amplified using previously described PCR conditions and primers [7,8], and directly sequenced using an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). This G to C substitution changes a critical residue in the USF E-box consensus element, abolishes USF-1 binding, and alters transcriptional activity. TS genotypes of the patients were classified according to Kawakami and Watanabe into two groups: high expression type (2/3G, 3C/3G and 3G/3G) and low expression type (2/2, 2/3C and 3C/3C) [18].

The MTHFR gene polymorphisms (677C \rightarrow T [rs1801133] and 1298 A \rightarrow C [rs1801131]) were determined. These two polymorphisms were analyzed using Fluidigm's Biomark system. This technology is designed for the allelic discrimination 5' nuclease assay. The samples and the TaqMan Gene expression assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were prepared following manufacturer's instructions. The 48.48 dynamic arrays used were automatically loaded using an IFC Controller (Fluidigm Corporation), and real-time reactions were performed and analyzed using BioMark Real-Time PCR System and Analysis software (Fluidigm Corporation), respectively. As a quality control, normal, heterozygote and homozygote sequenced samples were included on every array for each genotype. MTHFR genotypes were classified also into two groups: those associated with a decreased enzymatic activity (homozygous 677T, homozygous 1298C and compound heterozygous patients), and genotypes associated with an increased enzymatic activity (heterozygous and wild-type patients) [19]. Combined TS and MTHFR genotypes with respect to enzyme activities produced four groups: low TS expression and increased MTHFR activity (B+A), low TS expression and decreased MTHFR activity (B+B), high TS expression and increased MTHFR activity (A+A), and high TS expression and decreased MTHFR activity (A+B).

Statistical Analyses

Data are expressed as median with interquartile range (IQR) or as otherwise specified. Continuous variables were assessed with the nonparametric Mann-Whitney test and categorical data such as genotype and allele frequencies were compared by use of the Fisher's exact test. The level of significance was established at the 0.05 level and all reported P values are two-sided. A logistic regression analysis was used to examine the association of peripheral neuropathy and/or pancreatitis with TS and MTHFR

polymorphisms and other parameters; variables associated with a $P < 0.1$ in the univariate analyses were included in the multivariate stepwise analysis. All analyses were performed with the SAS version 9.1.3 software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Results

Population Studied

From January 1994 to December 2010, there were 102 cases of pancreatitis and/or peripheral neuropathy in our cohort; 34 cases of pancreatitis, 62 peripheral neuropathies and 6 cases with both pancreatitis and neuropathy. Of them, 63 (61.7%) were associated with d4T exposure, which had been taken at any time by 899 patients for a total exposure of 39,684 months. The incidence of d4T-associated pancreatitis and/or neuropathy was 19.05 (95% CI: 14.28–24.39) cases per 1000 patient-years (PY) in those exposed to d4T and 4.28 (3.13–5.86) in those not exposed ($P < 0.0001$). For peripheral neuropathy the incidences were 18.75 (14.62–24.05) and 1.98 (1.25–3.14), respectively ($P < 0.0001$), whereas for pancreatitis they were 10.28 (7.35–14.39) and 2.3 (1.50–3.54), respectively ($P < 0.0001$). We studied 172 HIV-1-infected, Caucasian patients, exposed to a d4T-based therapy (43 cases and 129 controls). There were no differences between the 43 cases studied and the 20 patients excluded because of lack of DNA. Demographic, means of acquiring HIV-1 infection and the immunovirological status of patients and controls are shown in table 1. There were 127 men (73.8%) and 45 women (26.2%), with a mean age of 51.1 ± 10.9 years (median: 49.0 [IQR: 42.0–58.0] years). Sixty-nine patients (40.1%) had had a prior AIDS-defining condition. Eight patients (18.6%) had pancreatitis, and 35 (81.4%) had peripheral neuropathy. Prior AIDS was significantly more frequent in cases than in controls (OR = 2.36; 95%CI: 1.10–5.07, $P = 0.0247$). No patient was diabetic or was using insulin or hypoglycemic agents. Alcohol abuse was documented in 11 patients (6.3%). The median daily alcohol consumption for alcohol abusers was 63.0 (IQR: 55.0–94.5) grams, without statistically significant differences between cases and controls ($P = 0.8738$).

Antiretroviral Drug Exposure and Immunovirological Status

Most of the patients (124, 72.9%) had undetectable viral load at the time of the study. The median viral load for those who had it detectable was 2.0 (IQR: 1.68–3.06) \log_{10} copies/ml. The mean CD4 count was 589 ± 291 cells/mm³ (median: 539 [IQR: 383–784]). Nadir CD4 cell count was < 200 cells/mm³ in 109 patients (60.5%) and < 100 cells/mm³ in 75 (41.7%). A CD4 cell count nadir < 200 cells/mm³ was significantly more frequent in cases (OR = 2.34; 95%CI: 1.03–5.58, $P = 0.0437$) (Table 1). The maximum viral load was above 5 \log_{10} copies/ml in 106 patients (61.6%). Four cases (9.3%) and 31 controls (24.0%) were receiving reduced d4T doses (OR = 0.32; 95%CI: 0.08–1.01, $P = 0.0630$). The cumulated exposure to antiretroviral drugs is shown in table 2. More cases than controls were receiving d4T plus ddI at event (53.5% vs. 34.1%, OR = 2.22; 95%CI: 1.04–4.76, $P = 0.0379$). None of the patients was receiving hydroxyurea.

Metabolic Data, Metabolic Syndrome and HALS

Metabolic and fat data are shown in table 3. There were no differences between cases and controls with respect to anthropometric and metabolic parameters. Sixty-nine patients (38.3%) had metabolic syndrome, without differences between cases and controls (OR = 1.59; 0.75–3.32, $P = 0.2498$). Ninety-three patients (54.1%) had HALS. HALS was less frequent in cases than in

controls (41.9% vs. 58.1%, OR = 0.52; 95%CI: 0.24–1.10, $P = 0.0932$).

TS and MTHFR Polymorphisms, and Development of Pancreatitis and/or Peripheral Neuropathy

The distribution of the different genotypes is shown in table 4. Ninety-one patients (52.9%) had a low expression TS genotype. This genotype was more frequent in patients with pancreatitis and/or peripheral neuropathy than in controls (72.1% vs. 46.5%, OR = 2.97; 95%CI: 1.33–6.90, $P = 0.0062$). The association remained statistically significant when peripheral neuropathy alone was considered (68.6% vs. 46.5%, OR = 2.51; 95%CI: 1.07–6.14, $P = 0.0336$), whereas there was a trend to significance for pancreatitis (87.5% vs. 46.5%, OR = 8.05; 95%CI: 0.98–367.94, $P = 0.0592$). Neither 677C→T ($P = 0.1119$) or 1298A→C ($P = 0.0708$) MTHFR polymorphisms were associated with the development of pancreatitis and/or peripheral neuropathy. However, when functional translation was taken into account MTHFR genotypes associated with increased enzymatic activity were more frequent in cases than in controls (79.1% vs. 56.6%, OR = 2.90, 95%CI: 1.23–7.41, $P = 0.01423$). The association remained statistically significant for peripheral neuropathy (77.1% vs. 58.4%, OR = 2.40, 95%CI: 0.97–6.55, $P = 0.0417$), but not for pancreatitis (87.5% vs. 60.9%, OR = 4.48, 95%CI: 0.55–205.51, $P = 0.2553$).

Combined TS and MTHFR genotypes with respect to peripheral neuropathy or pancreatitis are shown in table 4, where it is apparent that those combinations with a greater negative impact on TS activity were more frequently seen in cases.

Factors Associated with Development of Pancreatitis and/or Peripheral Neuropathy

A multivariable analysis was performed taking as the dependent variable the development of pancreatitis and/or peripheral neuropathy and as independent variables, age, sex, AIDS, CD4 count nadir < 200 /mm³, CD4 nadir < 100 /mm³, d4T exposure (m), d4T exposure (g), d4T exposure (mg/kg), AZT exposure (m), AZT exposure (g), ABC exposure (m), d4T plus ddI at event, EFV exposure (m), PI exposure (m), NRTI exposure (m), HALS, TS genotype (low vs. high expression), MTHFR genotype (increased vs. decreased enzymatic activity), and combined TS and MTHFR genotypes, all variables associated with a P value < 0.1 in the univariate analysis. Independent positive or negative predictors for the development of d4T-associated pancreatitis and/or peripheral neuropathy were: combined TS and MTHFR genotypes (reference: A+A; $P = 0.002$; OR_{A+B} = 0.34 [95%CI: 0.08 to 1.44], OR_{B+A} = 3.38 [95%CI: 1.33 to 8.57], OR_{B+B} = 1.13 [95%CI: 0.34 to 3.71]), nadir CD4 cell count > 200 cells/mm³ (OR = 0.38; 95%CI: 0.17–0.86, $P = 0.021$), and HALS (OR = 0.39 95%CI: 0.18–0.85, $P = 0.018$).

Discussion

Our study suggests an association between TS and MTHFR polymorphisms and the appearance of d4T-related toxicity in the form of acute pancreatitis or peripheral neuropathy. However, our work has inherent limitations. First, this is a case-control study and therefore no causal relationships should or must be drawn. Second, in case-control studies endpoint verification is of paramount importance. It is known that peripheral neuropathy or acute pancreatitis in the setting of HIV-1 infection treated with HAART may be caused not only by antiretroviral drugs but also by other drugs, alcohol abuse, or biliary stones and hypertriglyceridemia in the case of pancreatitis [20]. On the other hand,

Table 1. Demographics and immunovirological status of the population studied.

	Cases (N= 43)	Controls (N= 129)	P value
Age (yrs.)	48.0 (43.0–57.7)	50.0 (42.0–58.2)	0.9042
Males, n (%)	32 (74.4)	95 (73.6)	0.9999
Risk group			
Msm, n (%)	17 (39.5)	45 (34.9)	0.3366
Htsx, n (%)	14 (32.5)	55 (42.6)	
IDU, n (%)	11 (23.2)	30 (21.7)	
Other*, n (%)	2 (4.6)	1 (0.8)	
Years since diagnosis	13.0 (9.0–15.7)	13.0 (10.0–17.0)	0.4065
AIDS, n (%)	24 (55.8)	45 (34.9)	0.0195
Smokers, n (%)	17 (39.5)	70 (54.3)	0.1138
Alcohol abuse, n (%)	1 (2.3)	10 (7.7)	0.2952
HBV co-infection, n (%)	6 (13.9)	11 (8.5)	0.3751
HCV co-infection, n (%)	13 (30.2)	40 (31.0)	0.9999
Current CD4 count, cells/mm ³	515 (346–730)	543 (388–792)	0.5430
CD4 increase, cells/mm ³	386 (194–574)	339 (207–553)	0.6044
Current CD8 count cells/mm ³	834 (582–1181)	874 (617–1146)	0.6521
CD8 increase, cells/mm ³	555 (144–799)	370 (122–594)	0.1180
Nadir CD4 cell count, cells/mm ³	83 (23–206)	182 (54–314)	0.0091
Nadir CD4 cell count <100 cells/mm ³ , n (%)	24 (55.8)	45 (35.1)	0.0201
Nadir CD4 cell count <200 cells/mm ³ , n (%)	32 (74.4)	71 (55.5)	0.0314
Viral load, log ₁₀ , copies/ml	1.28 (1.28–1.28)	1.28 (1.28–1.55)	0.8307
Undetectable viral load, n (%)	33 (76.7)	91 (70.5)	0.5564
Maximum viral load, log ₁₀ , copies/ml	5.46 (4.70–5.79)	5.19 (4.29–5.58)	0.1479
Maximum viral load ≥5 log ₁₀ , copies/ml	31 (68.9)	75 (55.6)	0.0643
Viral load decrease, log ₁₀ , copies/ml	3.78 (2.84–4.28)	3.58 (2.53–4.16)	0.3725

Values are expressed as median and interquartile range, unless indicated.

*includes 2 patients with post-transfusion HIV and 1 with unknown risk, Msm = men who have sex with men, HTSX = heterosexuals, IDU = intravenous drug users, AIDS = acquired immune deficiency syndrome, HCV = hepatitis C virus, HBV = hepatitis B virus, ml = milliliters.

doi:10.1371/journal.pone.0057347.t001

there is no pathognomic test to etiologically ascribe the etiology of peripheral neuropathy or pancreatitis. Notwithstanding that, none of these well-known causes was present when patients in the study were diagnosed as having peripheral neuropathy or pancreatitis, except for alcohol abuse which in fact was more frequent among controls. Unfortunately, when the study was performed, intracellular d4T-TP concentrations in PBMCs were not available. Third, d4T is a well-known cause of peripheral neuropathy and pancreatitis, especially when combined with didanosine (ddI) or even more when combined with ddI and hydroxyurea [21]. Among our cases, 23 (53.5%) were also exposed to ddI, which may have contributed to the development of pancreatitis and/or peripheral neuropathy. Although cumulated exposure to ddI was not different in cases and controls, taking d4T plus ddI at event was statistically more frequent in cases. However, taking both drugs in combination was not an independent predictor for the development of peripheral neuropathy and/or acute pancreatitis. Fourth, there are a number of gene markers which have been associated with the risk of developing both toxic peripheral neuropathy and pancreatitis in HIV-infected patients on HAART, such as cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator (CTR) and serine protease inhibitor kazal-1 (SPINK-1) mutations for pancreatitis and mitochondrial haplotype T for peripheral neuropathy [22–24]. We cannot exclude the possibility that some

of these untested genes may have contributed to acute pancreatitis and/or peripheral neuropathy in our patients.

Acute pancreatitis in the setting of HIV infection and antiretroviral therapy has wide incidence rates ranging from 1.27 to 22.6 events/1000 PY [25–28]. These wide incidence rates may be explained by different diagnostic criteria (clinical vs. laboratory-based), and by the fact that some of the studies were performed in early calendar years, when more toxic drugs were used. Its appearance has been linked to the classical risk factors; i.e. alcohol abuse, hypertriglyceridemia, as well as to the use of antiretroviral drugs such as d4T and ddI [25–27]. The incidence rates for peripheral neuropathy have also been very wide, ranging from 0.7 to 39.7/1000 PY [29]. Known risk factors for developing peripheral neuropathy in HAART-treated patients include alcohol abuse, treatment with other neuropathic drugs (isoniazid, methotrexate,...), factors which were ruled out in our patients [30]. However, sometimes it is difficult to distinguish toxic peripheral neuropathy from exacerbation of HIV-associated neuropathy in HAART-treated patients, which may also contribute to these varying incidence rates. Notwithstanding that, none of our patients had clinical features consistent with peripheral neuropathy prior to taking d4T. The incidence of both acute pancreatitis and peripheral neuropathy in our work fall within these wide ranges, most probably because our study period spans throughout a long

Table 2. Antiretroviral drug exposure in the population studied.

Parameter	Cases (n = 43)	Controls (n = 129)	P value
ART composition at event			0.0154
PI-based, n (%)	33 (76.7)	69 (53.5)	
NNRTI-based, n (%)	10 (23.2)	51 (39.5)	
3 NRTIs, n (%)	0 (0.0)	9 (7.0)	
NRTI backbone at event			
d4T+3TC, n (%)	15 (34.9)	69 (53.5)	0.3335
d4T+ddl, n (%)	23 (53.5)	44 (34.1)	
d4T+ABC, n (%)	2 (4.6)	6 (4.6)	
d4T alone, n (%)	2 (4.6)	6 (4.6)	
d4T+3TC+ABC, n (%)	1 (2.3)	3 (2.3)	
d4T+3TC+ddl, n (%)	0 (0.0)	1 (0.8)	
Current d4T use, n (%)	0(0)	29 (22.5)	0.0015
Current AZT use, n (%)	13 (30.2)	4 (3.1)	<0.0001
ART duration (m)	110.0 (93.0–138.7)	115.0 (94.7–143.2)	0.4783
Individual drug exposure			
AZT exposure, m	43.0 (2.0–70.7)	11.0 (0.0–41.0)	0.0013
AZT exposure, g	559.6 (21.2–998.2)	158.8 (0.0–583.8)	0.0026
d4T exposure, m	26.0 (9.0–47.7)	57.0 (38.7–76.0)	<0.0001
d4T exposure, g	62.9 (21.8–109.8)	135.5 (86.7–177.2)	<0.0001
d4T exposure, mg/kg	1.15 (1.04–1.27)	1.06 (0.92–1.18)	0.0126
3TC/FTC exposure, m	68.0 (38.0–91.7)	70.0 (36.0–103.2)	0.6790
ddl exposure, m	11.0 (3.2–33.0)	17.0 (0.0–60.2)	0.2688
ddC exposure, m	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.7167
ABC exposure, m	2.0 (0.0–46.2)	0.0 (0.0–26.7)	0.0406
TDF exposure, m	0.0 (0.0–45.0)	14.0 (0.0–43.0)	0.3340
EFV exposure, m	0.0 (0.0–0.0)	2.0 (0.0–63.0)	0.0947
NVP exposure, m	6.0 (0.0–46.0)	2.0 (0.0–50.2)	0.6660
ETV exposure, m	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.3068
PI exposure, m	109.0 (28.2–168.7)	46.0 (22.7–97.5)	0.0123
NRTI exposure, m	196.0 (157.2–247.5)	224.0 (172.0–267.2)	0.0819

All parameters expressed as median and (interquartile range) unless indicated. HALS = HIV-1/HAART-associated lipodystrophy syndrome, ART = antiretroviral therapy, PI = protease inhibitor, NNRTI = non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI = nucleoside reverse transcriptase inhibitor, d4T = stavudine, 3TC = lamivudine, FTC = emtricitabine, TDF = tenofovir, ddl = didanosine, AZT = zidovudine, ddC = zalcitabine, ABC = abacavir, EFV = efavirenz, NVP = nevirapine, ETV = etravirine, m = months, g = grams, kg = kilograms. doi:10.1371/journal.pone.0057347.t002

time period when mitochondrially-toxic drugs were still widely used.

Acute pancreatitis has been associated with mutations in CTR and SPINK-1 genes both in the general population and in HIV-infected patients [22,23]. Among HIV-infected patients with acute clinical pancreatitis in a small study, 40% were carriers of CTR or SPINK-1 mutations [31]. Similarly, a number of gene polymorphisms have been described, associated with an increased risk of developing peripheral neuropathy associated with d4T and ddl use, including mitochondrial haplotype T [32], the mitochondrial polymorphism M1ND2/HON4917G, specific to haplogroup G [32], and the 282 C>Y hemochromatosis gene mutation [33].

Table 3. Anthropometric, metabolic and fat data in the population studied.

	Cases (n = 43)	Controls (n = 129)	P value
Weight, kg	64.7 (60.0–73.7)	65.5 (58.0–73.0)	0.7542
BMI, kg/m ²	23.5 (20.5–25.8)	23.8 (21.3–25.7)	0.5769
Waist circumference, cm	89.0 (81.2–93.7)	89.0 (82.7–95.0)	0.8006
WHR	0.96 (0.90–1.02)	0.95 (0.90–1.02)	0.8987
LSGS score, units	4.5 (2.0–10.0)	7.0 (3.4–11.1)	0.0386
Facial score, units	1.0 (0.0–2.0)	2.0 (0.7–2.0)	0.0222
Systolic BP, mm Hg	120 (120–138)	120 (110–130)	0.2025
Diastolic BP, mm Hg	75 (70–80)	75 (70–80)	0.6513
Metabolic syndrome, n (%)	21 (46.7)	48 (35.5)	0.2498
Total cholesterol, mmol/l	5.07 (4.18–6.03)	5.08 (4.44–5.92)	0.8966
Triglycerides, mmol/l	1.90 (1.17–3.22)	1.63 (1.12–2.54)	0.2752
HDL cholesterol, mmol/l	1.11 (0.95–1.32)	1.23 (0.97–1.53)	0.1690
LDL cholesterol, mmol/l	2.89 (2.28–3.65)	2.89 (2.46–3.50)	0.6693
VLDL cholesterol, mmol/l	0.88 (0.54–1.19)	0.77 (0.52–1.11)	0.3723
Fasting glucose, mmol/l	5.30 (5.02–5.87)	5.30 (4.90–6.00)	0.8317
HALS, n (%)	18 (41.9)	75 (58.1)	0.0932

All values expressed as median and (interquartile range) unless specified. HALS = HIV-1/HAART-associated lipodystrophy syndrome, BMI = body mass index, WHR = waist-hip ratio, LSGS = lipodystrophy severity grade score, mmol/l = millimoles per liter, HDL = high density lipoprotein, LDL = low density lipoprotein, VLDL = very low density lipoprotein, pmol/l = picomoles per liter, g = grams. doi:10.1371/journal.pone.0057347.t003

Among the factors independently associated with the development of neuropathy or pancreatitis, we found a low CD4 cell count nadir, a common marker for most toxicities and comorbidities [34,35]. Most probably it is a signal of increased inflammation and/or immune activation, which in turn contribute to overexpression of nucleoside transporters potentially leading to increased intracellular d4T-TP levels [36]. The association of TS and MTHFR polymorphisms with mitochondrial toxicity has biological plausibility, since genotypes which have a negative impact on TS activity are associated with higher d4T-TP intracellular levels and with fat redistribution, a well-known toxicity of mitochondrial origin [7,8]. Not surprisingly, we found that low expression TS genotypes are also associated with the appearance of d4T-induced mitochondrial toxicity in the form of peripheral neuropathy whereas the association for acute pancreatitis showed only a trend to statistical significance, most likely because of the small number of cases. A potentially contributing factor could have been that cases had a higher per weight exposure to d4T than controls, but again this was not an independent predictor of development of neuropathy or acute pancreatitis.

MTHFR gene is also polymorphic. The best known polymorphism consists of a 677 C→T transition in exon 4, which results in an alanine to valine substitution in the predicted catalytic domain of MTHFR. This substitution renders the enzyme thermolabile and homozygotes and heterozygotes have about 70% and 35% reduced enzyme activity, respectively [37]. A second common polymorphism in the MTHFR gene is a 1298 A→C transition in exon 7 which results in a glutamate to alanine substitution within a presumed regulatory domain of the protein [38]. The 1298C allele leads to a decreased enzyme activity, and individuals who are compound heterozygous for the 677T and

Table 4. Gene polymorphisms associated with the presence of pancreatitis and/or neuropathy in d4T-exposed patients.

	Cases (n = 43)	Controls (n = 129)	P value
TS genotype			
2R/2R, n (%)	9 (20.9)	19 (13.9)	0.0618
2R/3C, n (%)	15 (34.9)	30 (23.2)	
2R/3G, n (%)	7 (16.3)	35 (27.1)	
3C/3C, n (%)	7 (16.3)	11 (8.5)	
3C/3G, n (%)	5 (11.6)	25 (19.4)	
3G/3G, n (%)	0 (0.0)	10 (7.7)	
Low expression, n (%)	31 (72.1)	60 (46.5)	0.0046
High expression, n (%)	12 (27.9)	69 (53.5)	
MTHFR 677C→T genotype			
C/C, n (%)	21 (48.8)	42 (32.5)	0.1119
C/T, n (%)	18 (41.9)	63 (48.8)	
T/T, n (%)	4 (9.3)	24 (18.6)	
MTHFR 1298A→C genotype			
A/A, n (%)	22 (51.2)	64 (49.6)	0.0708
A/C, n (%)	14 (32.5)	58 (44.9)	
C/C, n (%)	7 (16.3)	7 (5.4)	
MTHFR genotypes and enzymatic activity			
Genotypes with increased activity*, n (%)	34 (79.1)	73 (56.6)	0.0066
Genotypes with decreased activity†, n (%)	9 (20.9)	56 (20.9)	
Combined TS and MTHFR genotypes			
Low expression and increased activity (B+A), n (%)	25 (58.1)	34 (26.3)	0.0013
Low expression and decreased activity (B+B), n (%)	6 (13.9)	26 (20.1)	
High expression and increased activity (A+A), n (%)	9 (20.9)	39 (30.2)	
High expression and decreased activity (A+B), n (%)	3 (6.9)	30 (23.2)	

TS = thymidylate synthase, MTHFR = methylene-tetrahydrofolate reductase,

*Heterozygous and wild-type patients, †Homozygous 677T, homozygous 1298C and compound heterozygous patients.

doi:10.1371/journal.pone.0057347.t004

1298C have a 40–50% reduced MTHFR activity [19]. Therefore, the non-mutated forms of MTHFR exhibit high enzymatic activity and should lead to high levels of intracellular 5,10-methylene tetrahydrofolate that will favor the formation and stability of the inhibitory ternary complex involving TS, 5,10-methylene tetrahydrofolate and deoxyuridine monophosphate [19]. Consequently, patients with non-mutated alleles should have a decreased TS activity, which in turn may lead to increased d4T-TP intracellular levels and to clinical toxicity including pancreatitis and peripheral neuropathy.

Stavudine-associated side effects may seem of only limited relevance today, because its use has greatly decreased in developed countries mainly due to its association with fat distribution abnormalities [39]. However, its use in developing countries as part of the starting antiretroviral regimens, with its associated toll of toxicities [1], is still common despite the WHO recommendation to substitute for less toxic NRTI when feasible [40].

References

- Mateo MG, Gutierrez MM, Vidal F, Domingo P (2012) Drug safety evaluation profile of stavudine plus lamivudine for HIV-1/AIDS infection. *Expert Opin Drug Saf* 11: 473–485.
- Koczor CA, Lewis W (2010) Nucleoside reverse transcriptase inhibitor toxicity and mitochondrial DNA. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6: 1493–1504.
- Brinkman K, ter Hofstede HJ, Burger DM, Smeitink JA, Koopmans PP (1998) Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS* 12: 1735–1744.
- Brinkman K, Smeitink JA, Romijn JA, Reiss P (1999) Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in

In summary, our study suggests that d4T-associated acute pancreatitis and/or peripheral neuropathy are associated with low-degree TS expression and MTHFR genotype associated with an increased enzymatic activity. There is a plausible pathogenic mechanism for such an association since it is well-known that, in d4T-treated patients, the presence of low-degree TS expression genotype is associated with increased d4T-TP intracellular concentrations and MTHFR genotype associated with an increased enzymatic activity contributes to a decreased TS functionality. This may be of value in tailoring d4T therapy when needed.

Author Contributions

Recruited the patients and controls: MdCC MdMG MGM EM IF ER. Conceived and designed the experiments: PD F. Vidal MB. Performed the experiments: MdCC MdMG MGM EM IF ER. Analyzed the data: PD F. Vidal MB FT. Contributed reagents/materials/analysis tools: JS MB JCD F. Villarroya. Wrote the paper: PD F. Villarroya F. Vidal FT MB.

- the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet* 354: 1112–1115.
5. Giralt M, Domingo P, Villarroya F (2011) Adipose tissue biology and HIV-infection. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25: 487–499.
 6. Vela JE, Miller MD, Rhodes GR, Ray AS (2008) Effect of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitors of HIV on endogenous nucleotide pools. *Antivir Ther* 13: 789–797.
 7. Domingo P, Cabeza MC, Pruvost A, Torres F, Salazar J, et al. (2010) Relationship between HIV/Highly active antiretroviral therapy (HAART)-associated lipodystrophy syndrome and stavudine-triphosphate intracellular levels in patients with stavudine-based antiretroviral regimens. *Clin Infect Dis* 50: 1033–1040.
 8. Domingo P, Cabeza MC, Pruvost A, Torres F, Salazar J, et al. (2011) Association of thymidylate synthase gene polymorphisms with stavudine triphosphate intracellular levels and lipodystrophy. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 1428–1435.
 9. Moore RD, Kenly JC, Chaisson RE (2001) Incidence of pancreatitis in HIV-infected patients receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitor drugs. *AIDS* 15: 617–620.
 10. Smith CJ, Olsen CH, Mocroft A, Viard JC, Staszewski S, et al. (2008) The role of antiretroviral therapy in the incidence of pancreatitis in HIV-positive individuals in the EuroSIDA study. *AIDS* 22: 47–56.
 11. Moore RD, Wong WM, Keruly JC, McArthur JC (2000) Incidence of neuropathy in HIV-infected patients on monotherapy versus those on combination therapy with didanosine, stavudine and hydroxyurea. *AIDS* 14: 273–278.
 12. Ellis RJ, Rosario D, Clifford DB, McArthur JC, Simpson D, et al. (2010) Continued high prevalence and adverse clinical impact of human immunodeficiency virus-associated sensory neuropathy in the era of combination antiretroviral therapy: the CHARTER Study. *Arch Neurol* 67: 552–558.
 13. Centers for Disease Control (1993) 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance for case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 41 (RR-17): 1–13.
 14. (2001) 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* 285: 2486–2497.
 15. Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, et al. (2005) Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112: 2735–2752.
 16. World Health Organization (2000) International Guide for monitoring alcohol consumption and related harm. World Health Organization.
 17. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
 18. Kawakami K, Watanabe G (2003) Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res* 63: 6004–6007.
 19. Marcuello E, Altés A, Menoyo A, Rio ED, Baiget M (2006) Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy? *Cancer Chemother Pharmacol* 57: 835–40.
 20. Whitcomb DC (2006) Acute pancreatitis. *N Engl J Med* 354: 2142–2150.
 21. Rutschmann OT, Vernazza PL, Bucher HC, Opravil M, Ledergerber B, et al. (2000) Long-term hydroxyurea in combination with didanosine and stavudine for the treatment of HIV-1 infection. Swiss HIV Cohort Study. *AIDS* 14: 2145–2151.
 22. Cohn JA, Friedman KJ (1998) Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 339: 653–658.
 23. Pfützer RH, Barmada MM (2000) SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 119: 615–623.
 24. Hulgán T, Haas DW (2005) Mitochondrial haplogroups and peripheral neuropathy during antiretroviral therapy: an adult AIDS Clinical Trial Group study. *AIDS* 19: 1341–1349.
 25. Riedel DJ, Gebo KA, Moore RD, Lucas GM (2008) A ten-year analysis of the incidence and risk factors for acute pancreatitis requiring hospitalization in an urban HIV clinical cohort. *AIDS Patient Care STDS* 22: 113–121.
 26. Reiser RB, Murphy RL, Redfield RR, Parker RA (2005) Incidence of pancreatitis in HIV-1-infected individuals enrolled in 20 adult AIDS clinical trials group studies: lessons learned. *J Acquir Immune Defic Syndr* 39: 159–166.
 27. Moore RD, Keruly JC, Chaisson RE (2001) Incidence of pancreatitis in HIV-infected patients receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitor drugs. *AIDS* 15: 617–620.
 28. Smith CJ, Olsen CH, Mocroft A, EuroSIDA Study Group (2008) The role of antiretroviral therapy in the incidence of pancreatitis in HIV-positive individuals in the EuroSIDA study. *AIDS* 22: 47–56.
 29. Ghosh S, Chandran A, Jansen JP (2012) Epidemiology of HIV-Related Neuropathy: A Systematic Literature Review. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28: 36–48.
 30. Evans SR, Ellis RJ, Chen H, Yeh T, Lee AJ, et al. (2011) Peripheral neuropathy in HIV: prevalence and risk factors. *AIDS* 25: 919–928.
 31. Felley C, Morris M (2004) The role of CFTR and SPINK-1 mutations in pancreatitis disorders in HIV-positive patients: a case-control study. *AIDS* 18: 1521–7.
 32. Canter J, Haas D (2008) The mitochondrial pharmacogenomics of haplogroup T: MTND2 (*) LHON4 917G and antiretroviral therapy-associated peripheral neuropathy. *Pharmacogenomics J* 8: 71–77.
 33. Kallianpur A, Hulgán T (2006) Hemochromatosis (HFE) gene mutations and peripheral neuropathy during antiretroviral therapy. *AIDS* 20: 1503–1513.
 34. Guaraldi G, Orlando G, Zona S, Menozzi M, Carli F, et al. (2011) Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. *Clin Infect Dis* 53: 1120–1126.
 35. Lichtenstein KA, Armon C, Buchacz K, Chmiel J, Moorman AC, et al. (2008) Initiation of Antiretroviral Therapy at CD4 Cell Counts \geq 350 Cells/mm³ Does Not Increase Incidence or Risk of Peripheral Neuropathy, Anemia, or Renal Insufficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr* 47: 27–35.
 36. Guallar JP, Cano-Soldado P, Aymerich I, Domingo JC, Alegre M, et al. (2007) Altered expression of nucleoside transporter genes (SLC28 and SLC29) in adipose tissue from HIV-1-infected patients. *Antivir Ther* 12: 853–863.
 37. Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, et al. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10: 111–113.
 38. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, et al. (1998) A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62: 1044–1051.
 39. Domingo P, Estrada V, Lopez Aldeguer J, Villarroya F, Martinez E (2012) Fat redistribution syndromes associated with HIV-1 infection and combination antiretroviral therapy: systematic review of current knowledge. *AIDS Rev* 14: 112–123.
 40. World Health Organization (2006) Addendum to 2006 HIV Treatment Guidelines. Available: <http://www.who.int/hiv/art/ARTadultsaddendum.pdf>. Accessed 2012 May 23.

DISCUSIÓN

Los hallazgos científicos en los que está basada esta tesis doctoral se exponen a continuación.

Tanto IPs como ITINs han sido relacionados con el desarrollo de síndrome de lipodistrofia asociado al tratamiento antirretroviral [Carr 1998, 1999, 2000// Saint-Marc]. La identificación de anabolitos de AZT (mono-, di- y trifosfato) en adipocitos murinos 20 minutos después de su administración demuestra que los análogos de la timidina entran rápidamente en las células y que su metabolismo es intracelular [Janneh]. Estos datos indican que el grado de fosforilación es comparable al observado en células de sangre periférica y líneas celulares linfoides [Sales// Lenhard// Zhang//Rudich].

La concentración intracelular de los dNTP determina tanto efecto antirretroviral mediante la unión a la TI como su efecto tóxico por inhibición de la Pol- α mitocondrial [Vela]. Los metabolitos TP de los ITINs pueden alterar el metabolismo de los nucleótidos endógenos mediante inhibición directa de los enzimas que metabolizan los nucleótidos, mediante la alteración de las interacciones alostéricas que regulan los pools celulares de dNTP o bien mediante la alteración de la expresión de los enzimas del metabolismo de los nucleótidos [Ray 2005].

Estudios previos han demostrado una reducción de la fosforilación de AZT al administrar timidina exógena ya que ambas compiten por los enzimas de fosforilación, llegando incluso a abolir parcialmente su actividad [Mitsuya]. Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con AZT influye en las concentraciones de diferentes metabolitos timidínicos, así dosis bajas de AZT (100 μ M) causan un aumento en los niveles endógenos de TTP, mientras que dosis mayores (1000 μ M) resultan en un descenso de los niveles de TTP, dATP y dGTP [Vela]. Los metabolitos TP de otros ITINs como el TFV, también han demostrado ejercer una importante regulación en los pools de nucleótidos mediante la inhibición del enzima PNP (purine nucleoside phosphorylase) [Ray 2004], encargado de producir nucleótidos monofosfato cuando la síntesis *de novo* ha sido interrumpida.

Bajo la hipótesis de que las concentraciones de los IPs juegan un papel importante en el desarrollo de la lipodistrofia, mediante la inhibición de la diferenciación de los adipocitos [Zhang] o inhibiendo el metabolismo de los esteroides [Christeff 1999], hasta la fecha solo existe un trabajo sobre la relación entre niveles de nelfinavir y el desarrollo de lipodistrofia [Tréluyer]. En este trabajo se relaciona de manera independiente la concentración media valle de nelfinavir con el desarrollo de lipodistrofia de manera global y con lipoatrofia periférica.

Las evidencias expuestas previamente nos llevaron a realizar un primer trabajo en el que medimos las concentraciones intracelulares de d4T-TP en células de sangre periférica de 33 pacientes que estaban recibiendo estavudina como parte de su tratamiento antirretroviral. Este trabajo nos permitió relacionar las mayores concentraciones intracelulares de fármaco con el desarrollo de lipodistrofia. Acorde con publicaciones previas donde se evidencian niveles mayores de AZT-TP y 3TC-TP en pacientes con infección por VIH-1 en estadios avanzados ^[Barry], en nuestro estudio se hallaron niveles más elevados de d4T-TP en pacientes que habían desarrollado previamente una condición definitoria de SIDA. Esto puede ser explicado por el hecho de que la activación celular, como ocurre en fases avanzadas de la infección, se ha relacionado con aumento de la fosforilación de AZT y 3TC. Por otra parte, estudios recientes han relacionado un polimorfismo en el gen de la IL-1 β (+3954C/T) asociado con menores niveles de citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo TNF- α) con un cierto papel protector respecto al desarrollo de lipodistrofia ^[Asensij]. Es por esto que una de las teorías sobre la etiología de la lipodistrofia, propone la inflamación del tejido adiposo como un mecanismo etiológico del HALS, asociando el polimorfismo 238G \rightarrow A en la región promotora del gen del TNF- α con el desarrollo de lipodistrofia ^[Maher]. Si bien un meta-análisis posterior no ha podido demostrar esa relación ^[Veloso].

En la infección por el VIH-1 una de los principales objetivos al elegir un determinado régimen antirretroviral es evitar en la mayor parte posible una posible toxicidad, ya que no solo influye en la evolución de la enfermedad y en la adherencia, sino también en la adaptación del paciente a su nueva situación ^[Juday]. Una de las herramientas de las que hemos comenzado a disponer de manera reciente es la farmacogenética.

Se han descrito polimorfismos relacionados con modificaciones en el metabolismo de los fármacos o incluso con su perfil tóxico. Así, los polimorfismos CYP2B6 516G \rightarrow T y CYP2B6 983T \rightarrow C se han vinculado con efectos secundarios del EFV sobre el sistema nervioso central (SNC) en la primera semana de tratamiento ^[Haas, Wang J] y con mayores concentraciones plasmáticas del fármaco durante las primeras 24 semanas de tratamiento. Sin embargo, existe una tolerancia del SNC a los efectos secundarios ya que no se pudo relacionar ni los polimorfismos ni las concentraciones plasmáticas más elevadas con persistencia de los síntomas. Por otra parte, este mismo polimorfismo se ha relacionado también con concentraciones plasmáticas mayores de NVP y con mayores concentraciones intracelulares de EFV ^[Rotger Enero 2005]. El desarrollo de hiperbilirrubinemia no conjugada en el tratamiento con IDV y ATZ se ha relacionado con un polimorfismo en el elemento promotor TATA del gen que codifica la isoforma UGT1A1 del enzima UDP-glucuronosil transferasa

(UGT). Los promotores que contienen 7 repeticiones de los nucleótidos timina-adenosina (TA) , A(TA)₇TAA (alelo UGT1A1*28), son menos activos que los promotores que contienen 6 repeticiones de TA y por tanto los homocigotos para el alelo UGT1A1*28 presentan niveles más elevados de bilirrubina no conjugada ^[Rotger Octubre 2005].

El enzima clave en el metabolismo de las pirimidinas y que se ve influenciado con la administración de inhibidores de la transcriptasa inversa análogos timidínicos de los nucleótidos (AZT y d4T) es la TS. El gen que codifica este enzima es polimórfico como se ha explicado anteriormente. Ante la evidencia de que las células homocigotas 3R/3R se asocian con mayor actividad de la TS realizamos un segundo trabajo para comprobar si los polimorfismos de los enzimas del metabolismo de las pirimidinas influyen en las concentraciones de d4T-TP intracelulares. Estudiamos los polimorfismos de la TS distinguiendo entre los de alta expresión del enzima (2/3G, 3C/3G, 3G/3G) y los de baja expresión (2/2, 2/3C, 3C/3C) y a su vez, como la actividad TS puede ser regulada por las actividades de otros enzimas como son MTHFR, DHFR y RFC1 también estudiamos los polimorfismos de los genes de estos enzimas. Encontramos que únicamente los polimorfismos asociados a menor actividad de la TS se asociaron con concentraciones intracelulares de d4T-TP mayores. El d4T-TP compete con los dNTP naturales tanto por la TI como por la Pol- α mitocondrial. Esta inhibición competitiva conlleva una desregulación de los pools de dTTP naturales en la mitocondria que pueden afectar a la replicación del mtADN ^[Löffler], lo que explica en parte su toxicidad. Esta disregulación, al disminuir los pools de dTTP, favorece el aumento de las concentraciones intracelulares de d4T-TP. Se ha demostrado previamente que agentes inhibidores de la TS que depleccionan las células de dTTP como el 5-Fluorouracilo y su desoxinucleósido (29-deoxi-5-fluorouridina) actuando sobre la vía de síntesis *de novo* de las pirimidinas, pueden aumentar la fosforilación del d4T ^[Gao 1999].

A su vez demostramos una relación entre los polimorfismos de baja expresión de la TS y el desarrollo de HALS. La prevalencia de los polimorfismos de la TS es diferente en diversas regiones de mundo. Así, por ejemplo, el 50% de la población caucásica es heterocigoto y cada uno de los homocigotos supone el 25% de la misma, con similares frecuencias en la población negra y en el sudeste asiático ^[Marsh]. Sin embargo, la presencia del homocigoto de 3 repeticiones en tándem entre la población china es dos veces más común (67%) que en la población blanca (38%) ^[Marsh]. Este hecho

podría explicar porque el desarrollo de HALS es tan poco frecuente entre la población de los países del este asiático ^[Chang].

La toxicidad mitocondrial asociada a los ITINs abarca un amplio abanico de manifestaciones clínicas, no únicamente el HALS. Por lo que a raíz de los hallazgos del segundo artículo, realizamos un tercer trabajo basado en un estudio de casos y controles en pacientes expuestos a d4T para valorar si en los pacientes en tratamiento con d4T era más frecuente el desarrollo de pancreatitis aguda o neuropatía periférica. Ambas manifestaciones se han asociado en los pacientes VIH a otras causas diferentes del d4T como son la litiasis biliar o la hipertrigliceridemia en el caso de la pancreatitis o el abuso de alcohol y el uso de otros fármacos, por ejemplo ddl, isoniazida o metotrexate en el desarrollo de la neuropatía periférica. Sin embargo, a excepción del consumo de alcohol, que es más frecuente en los controles, ninguna de estas causas está presente en el momento del diagnóstico, por lo que consideramos secundarias al tratamiento antirretroviral.

Respecto a la neuropatía periférica encontramos una asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos de baja expresión y el desarrollo de toxicidad mitocondrial, en el caso de la pancreatitis, los datos muestran una cierta tendencia pero sin resultar significativa. Probablemente esto se debe al menor número de casos de pancreatitis (32) presente en el estudio en comparación con los de neuropatía (34 vs 62).

Los d-fármacos antirretrovirales (d4T,ddl, ddC) han sido relacionados con el desarrollo de toxicidad mitocondrial, especialmente la asociación ddl y d4T. Si bien es cierto que la asociación de d4T con ddl en el momento del evento es estadísticamente más frecuente entre los casos, la toma conjunta de ambos fármacos no resultó ser un factor independiente para predecir el la aparición de neuropatía periférica o/y pancreatitis aguda.

Estudios previos en pacientes con infección VIH-1 en tratamiento antirretroviral, han demostrado la asociación de determinados marcadores genéticos con el desarrollo de ambas toxicidades. Así por ejemplo, en un estudio retrospectivo realizado en los participantes del estudio ACTG384 llevado a cabo en USA, la neuropatía periférica se observó que los factores que demostraron ser predictores independientes para el desarrollo neuropatía periférica fueron la

exposición a d4T y ddl conjunta, edad avanzada y el haplotipo mitocondrial T ^[Hulgan], encontrado principalmente en población de descendencia europea. Este haplotipo T ha sido asociado con la neuropatía óptica hereditaria de Leber ^[Torrioni]. Otros polimorfismos estudiados han sido MTND2/HON4917G del haplotipo G ^[Canter] y la mutación C282Y del gen de la hemocromatosis.

Respecto a la pancreatitis, las mutaciones en los genes del inhibidor de la proteasa de la serina kazal-1 (SPINK-1, en inglés) o en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CTR, en inglés) han sido implicados en el desarrollo de toxicidad ^[Pfützer//Cohn].

Si bien el estudio de casos y controles no puede demostrar relación de causa y efecto, consideramos que la asociación de los polimorfismos de la TS con el desarrollo de pancreatitis y neuropatía periférica es plausible ya que los polimorfismos de baja expresión genética se han relacionado con mayores concentraciones intracelulares de d4T-TP y sabemos por estudios previos que la toxicidad de los ITINs depende de su capacidad de modificar los pools intracelulares de dTTP y consecuentemente, de su capacidad de inhibir la Pol- α mitocondrial.

En resumen, nuestro trabajo sobre los polimorfismos de la Timidilato Sintasa nos ha permitido demostrar una asociación, que no una relación causal, entre los polimorfismos de baja expresión genética de la enzima y el aumento de la concentración intracelular de d4T-TP en pacientes con infección por VIH-1 en tratamiento antirretroviral basado en inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de la timidina. Las concentraciones intracelulares de metabolito trifosfato de d4T se han asociado además con el desarrollo de toxicidad como es la lipodistrofia, la pancreatitis aguda y la neuropatía periférica.

CONCLUSIONES

1. Los polimorfismos de baja expresión de la TS (2/2, 2/3C, 3C/3C) se relacionan con niveles de d4T-TP intracelulares mayores.
2. Los pacientes con los polimorfismos de baja expresión de la TS presentan menor grasa apendicular y HALS con más frecuencia que los pacientes con polimorfismos asociados a una mayor actividad.
3. Los polimorfismos de baja expresión de la TS se asocian al desarrollo de pancreatitis aguda y neuropatía periférica en pacientes con regímenes que contienen estavudina a través de un aumento de las concentraciones intracelulares del mismo.
4. Los niveles de d4T intracelular durante el estudio se han medido en leucocitos de sangre periférica, por lo que no se puede asegurar que a mayor concentración intracelular de d4T mayor toxicidad a nivel del tejido adiposo.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Anderson PL, Kakuda TN, Lichtenstein KA. The cellular pharmacology of nucleoside- and nucleotide-analogue reverse-transcriptase inhibitors and its relationship to clinical toxicities. *Clin Infect Dis*. 2004 Mar 1;38(5):743-53. Epub 2004 Feb 18.
- Apostolova N, Blas-García A, Esplugues JV. Mitochondrial toxicity in HAART: an overview of *in vitro* evidence. *Curr Pharm Des*. 2011;17(20):2130-44.
- Arnaudo E, Dalakas M, Shanske S, Moraes CT, DiMauro S, Schon EA. Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy. *Lancet*. 1991 Mar 2;337(8740):508-10.
- Asensi V, Rego C, Montes AH, Collazos J, Carton JA, Castro MG, Alvarez V, Fernández C, Maradona JA, Valle-Garay E. IL-1beta (+3954C/T) polymorphism could protect human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients on highly active antiretroviral treatment (HAART) against lipodystrophic syndrome. *Genet Med*. 2008 Mar;10(3):215-23. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181632713.

B

- Bacchetti P, Gripshover B, Grunfeld C, Heymsfield S, McCreath H, Osmond D, Saag M, Scherzer R, Shlipak M, Tien P; Study of Fat Redistribution and Metabolic Change in HIV Infection (FRAM). Fat distribution in men with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Oct 1;40(2):121-31.
- Badiou S, De Boever CM, Dupuy AM, Baillat V, Cristol JP, Reynes Small dense LDL and atherogenic lipid profile in HIV-positive adults: influence of lopinavir/ritonavir-containing regimen. *AIDS*. 2003 Mar 28;17(5):772-4.
- Balzarini J, Cooney DA, Dalal M, Kang GJ, Cupp JE, DeClercq E, Broder S, Johns DG. 2',3'-Dideoxycytidine: regulation of its metabolism and anti-retroviral potency by natural pyrimidine nucleosides and by inhibitors of pyrimidine nucleotide synthesis. *Mol Pharmacol*. 1987 Dec;32(6):798-806.
- Balzarini J, De Clercq E. Analysis of inhibition of retroviral reverse transcriptase. *Methods Enzymol*. 1996;275:472-502.
- Balzarini J, De Clercq E. Biochemical pharmacology of nucleoside and non-nucleoside analogues active against HIV reverse transcriptase. En: Merigan TC, Barlett JG, Bolognesi DP. (eds) *Textbook of AIDS Medicine*, 2ª edición. 1998. Williams & Wilkins. Baltimore. Pags 815-847.
- Bailey CM, Kasiviswanathan R, Copeland WC, Anderson KS. R964C mutation of DNA polymerase gamma imparts increased stavudine toxicity by decreasing nucleoside analog discrimination and impairing polymerase activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jun;53(6):2610-2. doi: 10.1128/AAC.01659-08. Epub 2009 Apr 13.

- Barry M, Wild M, Veal G, Back D, Breckenridge A, Fox R, Beeching N, Nye F, Carey P, Timmins D. Zidovudine phosphorylation in HIV-infected patients and seronegative volunteers. *AIDS*. 1994 Aug;8(8):F1-5.
- Behrens GM, Boerner AR, Weber K, van den Hoff J, Ockenga J, Brabant G, Schmidt RE. Impaired glucose phosphorylation and transport in skeletal muscle cause insulin resistance in HIV-1-infected patients with lipodystrophy. *J Clin Invest*. 2002 Nov;110(9):1319-27.
- Behrens GM, Schmidt RE. Lipodystrophy syndrome. En: Hoffman C, Rockstroh JK, Kamps BS editor. *HIV Medicine 2006*. Hamburg, Bonn, Paris. 2006. Flying Publisher. Pag. 301-313.
- Behrens GM, Boerner AR, Weber K, van den Hoff J, Ockenga J, Brabant G, Schmidt RE. Impaired glucose phosphorylation and transport in skeletal muscle cause insulin resistance in HIV-1-infected patients with lipodystrophy. *J Clin Invest*. 2002 Nov;110(9):1319-27.
- Berger AR, Arezzo JC, Schaumburg HH, Skowron G, Merigan T, Bozzette S, Richman D, Soo W. 2',3'-dideoxycytidine (ddC) toxic neuropathy: a study of 52 patients. *Neurology*. 1993 Feb;43(2):358-62.
- Bissuel F, Bruneel F, Habersetzer F, Chassard D, Cotte L, Chevallier M, Bernuau J, Lucet JC, Trepo C. Fulminant hepatitis with severe lactate acidosis in HIV-infected patients on didanosine therapy. *J Intern Med*. 1994 Apr;235(4):367-71.
- Blum AS, Dal Pan GJ, Feinberg J, Raines C, Mayjo K, Cornblath DR, McArthur JC. Low-dose zalcitabine-related toxic neuropathy: frequency, natural history, and risk factors. *Neurology*. 1996 Apr;46(4):999-1003.
- Blümer RM, van Vonderen MG, Sutinen J, Hassink E, Ackermans M, van Agtmael MA, Yki-Jarvinen H, Danner SA, Reiss P, Sauerwein HP. Zidovudine/lamivudine contributes to insulin resistance within 3 months of starting combination antiretroviral therapy. *AIDS*. 2008 Jan 11;22(2):227-36.
- Brannagan TH 3rd, Nuovo GJ, Hays AP, Latov N. Human immunodeficiency virus infection of dorsal root ganglion neurons detected by polymerase chain reaction in situ hybridization. *Ann Neurol*. 1997 Sep;42(3):368-72.
- Brendel K, Legrand M, Taburet AM, Baron G, Goujard C, Mentré F; Cophar 1-ANRS 102 Trial Group. Population pharmacokinetic analysis of indinavir in HIV-infected patient treated with a stable antiretroviral therapy. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005 Jun;19(3):373-83.
- Brinkman K, ter Hofstede HJ, Burger DM, Smeitink JA, Koopmans PP. Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS*. 1998 Oct 1;12(14):1735-44.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA, Jawetz, Melnick & Aldelberg's Medical Microbiology Chapter. 2013 McGraw Hill. 26th edition. Pags 653-669.
- Browne MJ, Mayer KH, Chafee SB, Dudley MN, Posner MR, Steinberg SM, Graham KK, Geletko SM, Zinner SH, Denman SL, et al. 2',3'-dideoxy-3'-deoxythymidine (d4T) in patients with AIDS or AIDS-related complex: a phase I trial. *J Infect Dis*. 1993 Jan;167(1):21-9.
- Bukrinsky MI, Sharova N, McDonald TL, Pushkarskaya T, Tarpley WG, Stevenson M. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jul 1;90(13):6125-9.

- Butt AA, McGinnis K, Rodriguez-Barradas MC, Crystal S, Simberkoff M, Goetz MB, Leaf D, Justice AC; Veterans Aging Cohort Study. HIV infection and the risk of diabetes mellitus. *AIDS*. 2009 Jun 19;23(10):1227-34.

C

- Canter JA, Haas DW, Kallianpur AR, Ritchie MD, Robbins GK, Shafer RW, Clifford DB, Murdock DG, Hulgan T. The mitochondrial pharmacogenomics of haplogroup T: MTND2*LHON4917G and antiretroviral therapy-associated peripheral neuropathy. *Pharmacogenomics J*. 2008 Feb;8(1):71-7. Epub 2007 Aug 7.
- Carr A, Samaras K, Burton S, Law M, Freund J, Chisholm DJ, Cooper DA. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS*. 1998 May 7;12(7):F51-8.
- 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; 353:2093–2099.
- Carr A, Miller J, Law M, Cooper DA. A syndrome of lipoatrophy, lactic acidemia and liver dysfunction associated with HIV nucleoside analogue therapy: contribution to protease inhibitor-related lipodystrophy syndrome. *AIDS*. 2000 Feb 18;14(3):F25-32.
- Carr A, Emery S, Law M, et al.: An objective case definition of lipodystrophy in HIV-infected adults: A case-control study. *Lancet* 2003;361:726–735.
- Carr A. HIV lipodystrophy: risk factors, pathogenesis, diagnosis and management. *AIDS*. 2003 Apr;17 Suppl 1:S141-8.
- Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ, de Almeida IT. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C-->T and 1298A-->C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet*. 2004 Jun;41(6):454-8.
- Cazzalini O, Lazzè MC, Iamele L, Stivala LA, Bianchi L, Vaghi P, Cornaglia A, Calligaro A, Curti D, Alessandrini A, Prosperi E, Vannini V. Early effects of AZT on mitochondrial functions in the absence of mitochondrial DNA depletion in rat myotubes. *Biochem Pharmacol*. 2001 Oct 1;62(7):893-902.
- Centers for Disease Control: Pneumocystis Pneumonia- Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1981 Jun 5;30(21):250-2.
- Centers for Disease Control (CDC). A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1982 Jun 18;31(23):305-7.
- Centers for Disease Control: Follow up on Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1981 Jul 3;30(25):305-8.

- Centers for Disease Control (CDC). A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1982 Jun 18;31(23):305-7.
- Centers for Diseases Control. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1982 Sep 24;31(37):507-8, 513-4.
- Chabes A, Thelander L. Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks. J Biol Chem. 2000 Jun 9;275(23):17747-53.
- Chang KH, Kim JM, Song YG, Hong SK, Lee HC, Lim SK. Does race protect an oriental population from developing lipodystrophy in HIV-infected individuals on HAART? J Infect. 2002 Jan;44(1):33-8.
- Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, Nicolas JP. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. Mol Genet Metab. 2000 Aug;70(4):310-5.
- Chermann JC, Barré-Sinoussi F, Dauguet C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. Antibiot Chemother. 1983;32:48-53.
- Chiappini F, Teicher E, Saffroy R, Debuire B, Vittecoq D, Lemoine A. Relationship between polymerase gamma (POLG) polymorphisms and antiretroviral therapy-induced lipodystrophy in HIV-1 infected patients: a case-control study. Curr HIV Res. 2009 Mar;7(2):244-53.
- Childs EA, Lyles RH, Selnes OA, Chen B, Miller EN, Cohen BA, Becker JT, Mellors J, McArthur JC. Plasma viral load and CD4 lymphocytes predict HIV-associated dementia and sensory neuropathy. Neurology. 1999 Feb;52(3):607-13.
- Christeff N, Melchior JC, de Truchis P, Perronne C, Nunez EA, Gougeon ML. Lipodystrophy defined by a clinical score in HIV-infected men on highly active antiretroviral therapy: correlation between dyslipidaemia and steroid hormone alterations. AIDS. 1999 Nov 12;13(16):2251-60.
- Christeff N, Melchior JC, de Truchis P, Perronne C, Gougeon ML. Increased serum interferon alpha in HIV-1 associated lipodystrophy syndrome. Eur J Clin Invest. 2002 Jan;32(1):43-50.
- Christopherson RI, Lyons SD, Wilson PK. Inhibitors of *de novo* nucleotide biosynthesis as drugs. Acc Chem Res. 2002 Nov;35(11):961-71.
- Cihlar T, Ray AS. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. Antiviral Res. 2010 Jan;85(1):39-58.
- Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. N Engl J Med. 1998 Sep 3;339(10):653-8.
- Cornblath DR, McArthur JC. Predominantly sensory neuropathy in patients with AIDS and AIDS-related complex. Neurology. 1988 May;38(5):794-6.
- Côté HC, Brumme ZL, Craib KJ, Alexander CS, Wynhoven B, Ting L, Wong H, Harris M, Harrigan PR, O'Shaughnessy MV, Montaner JS. Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients. N Engl J Med. 2002 Mar 14;346(11):811-20.

- Craig JC, Duncan IB, Hockley D, Grief C, Roberts NA, Mills JS. Antiviral properties of Ro 31-8959, an inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV) proteinase. *Antiviral Res.* 1991 Dec;16(4):295-305.

D

- Dalakas MC. Peripheral neuropathy and antiretroviral drugs. *J Peripher Nerv Syst.* 2001 Mar;6(1):14-20. Review.
- Davenport MP, Loh L, Petravic J, Kent SJ. Rates of HIV immune escape and reversion: implications for vaccination. *Trends Microbiol.* 2008 Dec;16(12):561-6.].
- De Francesco MA, Baronio M, Fiorentini S, Signorini C, Bonfanti C, Poesi C, Popovic M, Grassi M, Garrafa E, Bozzo L, Lewis GK, Licenziati S, Gallo RC, Caruso A. HIV-1 matrixprotein p17 increases the production of proinflammatory cytokines and counteracts IL-4 activitybybindingto a cellular receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 23;99(15):9972-7.
- Dowdle WR. The epidemiology of AIDS. *Public Health Rep.* 1983 Jul-Aug;98(4):308-12.
- Dulucq S, St-Onge G, Gagné V, Ansari M, Sinnett D, Labuda D, Moghrabi A, Krajinovic M. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood.* 2008 Apr 1;111(7):3692-700. Epub 2007 Dec 20.
- Dutta SK, Ting CD, Lai LL. Study of prevalence, severity, and etiological factors associated with acute pancreatitis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Am J Gastroenterol.* 1997 Nov;92(11):2044-8

E

- El-Khatib Z, DeLong AK, Katzenstein D, Ekstrom AM, Ledwaba J, Mohapi L, Laher F, Petzold M, Morris L, Kantor R. Drug resistance patterns and virus re-suppression among HIV-1 subtype C infected patients receiving non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in South Africa. *J AIDS Clin Res.* 2011 Feb 18;2(117).
- El-Khatib Z, Ekstrom AM, Coovadia A, Abrams EJ, Petzold M, Katzenstein D, Morris L, Kuhn L. Adherence and virologic suppression during the first 24 weeks on antiretroviral therapy among women in Johannesburg, South Africa - a prospective cohort study. *BMC Public Health.* 2011 Feb 8;11:88.
- Emerman M and Malim MH. HIV-1 Regulatory/Accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 1998; 280:1880-4.
- Estrada V, Portilla J. Dyslipidemiarelatedto antiretroviral therapy. *AIDS Rev.* 2011 Jan-Mar;13(1):49-56.
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. 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.

F

- Fauvel J, Bonnet E, Ruidavets JB, Ferrières J, Toffoletti A, Massip P, Chap H, Perret B. An interaction between apo C-III variants and protease inhibitors contributes to high triglyceride/low HDL levels in treated HIV patients. *AIDS*. 2001 Dec 7;15(18):2397-406.
- Flexner C. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med*. 1998 Apr 30;338(18):1281-92.
- Fleischman A, Johnsen S, Systrom DM, Hrovat M, Farrar CT, Frontera W, Fitch K, Thomas BJ, Torriani M, Côté HC, Grinspoon SK. Effects of a nucleoside reverse transcriptase inhibitor, stavudine, on glucose disposal and mitochondrial function in muscle of healthy adults. *Am J PhysiolEndocrinolMetab*. 2007 Jun;292(6):E1666-73.

G

- Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Mar 25;316(2):129-39.
- Gallant JE, Staszewski S, Pozniak AL, DeJesus E, Suleiman JM, Miller MD, Coakley DF, Lu B, Toole JJ, Cheng AK; 903 Study Group. Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naïve patients: a 3-year randomized trial. *JAMA*. 2004 Jul 14;292(2):191-201.
- Galli M, Ridolfo AL, San Diego: First International Workshop on Adverse Drug Reactions and Lipodystrophy in HIV, 1999 (abstr 20)
- Gao WY, Shirasaka T, Johns DG, Broder S, Mitsuya H. Differential phosphorylation of azidothymidine, dideoxycytidine, and dideoxyinosine in resting and activated peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest*. 1993 May;91(5):2326-33.
- Gao WY, Johns DG, Tanaka M, Mitsuya H. Suppression of replication of multidrug-resistant HIV type 1 variants by combinations of thymidylate synthase inhibitors with zidovudine or stavudine. *Mol Pharmacol*. 1999 Mar;55(3):535-40.
- Goedert JJ, Neuland CY, Wallen WC, Greene MH, Mann DL, Murray C, Strong DM, Fraumeni JF Jr, Blattner WA. Amyl nitrite may alter T lymphocytes in homosexual men. *Lancet*. 1982 Feb 20;1(8269):412-6.
- Graziewicz MA, Longley MJ, Copeland WC. DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem Rev*. 2006 Feb;106(2):383-405.
- 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.
- Groopman JE, Detsky AS. Epidemic of the acquired immunodeficiency syndrome: a need for economic and social planning. *Ann Intern Med*. 1983 Aug;99(2):259-61.
- Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, Shigenaga JK, Jensen P, Feingold KR. Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992 May;74(5):1045-52.

- Gorry PR, Ancuta P. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep* 2011;8:45-53
- Guardiola M, Ferré R, Salazar J, Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, Masana L, Ribalta J. Protease inhibitor-associated dyslipidemia in HIV-infected patients is strongly influenced by the APOA5-1131T->C gene variation. *Clin Chem*. 2006 Oct;52(10):1914-9. Epub 2006 Aug 3.
- Gutiérrez Maciá MM, Mateo García MG, Vidal Marsal F, Domingo Pedrol P. Toxicogenetics of antiretroviral treatment (1): lipodystrophy, metabolic perturbations and atherosclerosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008 May;26 Suppl 6:18-23.

H

- Haas DW, Ribaud HJ, Kim RB, Tierney C, Wilkinson GR, Gulick RM, Clifford DB, Hulgan T, Marzolini C, Acosta EP. Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. *AIDS*. 2004 Dec 3;18(18):2391-400.
- Hadigan C, Meigs JB, Corcoran C, Rietschel P, Piecuch S, Basgoz N, Davis B, Sax P, Stanley T, Wilson PW, D'Agostino RB, Grinspoon S. Metabolic abnormalities and cardiovascular disease risk factors in adults with human immunodeficiency virus infection and lipodystrophy. *Clin Infect Dis*. 2001 Jan;32(1):130-9. Epub 2000 Dec 15.
- Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study? *Lancet*. 2005 Oct 8;366(9493):1315-23.
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;447(5):465-8. Epub 2003 Nov 18.
- Hetherington S, McGuirk S, Powell G, Cutrell A, Naderer O, Spreen B, Lafon S, Pearce G, Steel H. Hypersensitivity reactions during therapy with the nucleoside reverse transcriptase inhibitor abacavir. *Clin Ther*. 2001 Oct;23(10):1603-14.
- Honda Y, Rogers L, Nakata et al. Type I interferon induces inhibitory 16-kD CCAAT/ enhancer binding protein (C/EBP) beta, repressing the HIV-1 long terminal repeat in macrophages: pulmonary tuberculosis alters C/EBP expression, enhancing HIV-1 replication. *J Exp Med*. 1998 Oct 5;188(7):1255-65.
- Hudson AT, Dickins M, Ginger CD, Gutteridge WE, Holdich T, Hutchinson DB, Pudney M, Randall AW, Latter VS. 566C80: a potent broad spectrum anti-infective agent with activity against malaria and opportunistic infections in AIDS patients. *Drugs Exp Clin Res*. 1991;17(9):427-35.
- Hruz PW. Molecular mechanisms for insulin resistance in treated HIV-infection. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jun;25(3):459-68.
- Hulgan T, Haas DW, Haines JL, Ritchie MD, Robbins GK, Shafer RW, Clifford DB, Kallianpur AR, Summar M, Canter JA. Mitochondrial haplogroups and peripheral neuropathy during antiretroviral therapy: an adult AIDS clinical trials group study. *AIDS*. 2005 Sep 2;19(13):1341-9.

- Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem cell transplantation. *N Eng J Med* 2009;692-8.

I

- Igoudjil A, Massart J, Begriche K, Descatoire V, Robin MA, Fromenty B. High concentrations of stavudine impair fatty acid oxidation without depleting mitochondrial DNA in cultured rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*. 2008 Jun;22(4):887-98. doi: 10.1016/j.tiv.2008.01.011. Epub 2008 Jan 26.
- Imhof A, Ledergerber B, Günthard HF, Haupts S, Weber R; Swiss HIV Cohort Study Risk factors for and outcome of hyperlactatemia in HIV-infected persons: is there a need for routine lactate monitoring? *Clin Infect Dis*. 2005 Sep 1;41(5):721-8. Epub 2005 Jul 29.

J

- Jackman AL, Calvert AH. Folate-based thymidylate synthase inhibitors as anticancer drugs. *Ann Oncol*. 1995 Nov;6(9):871-81.
- Jacobsen H, Haenggi M, Ott M, Duncan IB, Andreoni M, Vella S, Mous J. Reduced sensitivity to saquinavir: an update on genotyping from phase I/II trials. *Antiviral Res*. 1996 Jan;29(1):95-7.
- Jaffe HW, Bregman DJ, Selik RM. Acquired immune deficiency syndrome in the United States: the first 1,000 cases. *J Infect Dis*. 1983 Aug;148(2):339-45.
- Jaffe HW, Darrow WW, Echenberg DF, O'Malley PM, Getchell JP, Kalyanaraman VS, Byers RH, Drennan DP, Braff EH, Curran JW, et al. The acquired immunodeficiency syndrome in a cohort of homosexual men. A six-year follow-up study. *Ann Intern Med*. 1985 Aug;103(2):210-4.
- Janneh O, Hoggard PG, Tjia JF, Jones SP, Khoo SH, Maher B, Back DJ, Pirmohamed M. Intracellular disposition and metabolic effects of zidovudine, stavudine and four protease inhibitors in cultured adipocytes. *Antivir Ther*. 2003 Oct;8(5):417-26.
- Jayappa KD, Ao Z, Yao X. The HIV-1 passage from cytoplasm to nucleus: the process involving a complex exchange between the components of HIV-1 and cellular machinery to access nucleus and successful integration. *Int J BiochemMol Biol*. 2012;3(1):70-85..
- John M, Mallal S. Hyperlactatemia syndromes in people with HIV infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2002 Feb;15(1):23-9.
- Jones SP, Qazi N, Morelese J, Lebrecht D, Sutinen J, Yki-Järvinen H, Back DJ, Pirmohamed M, Gazzard BG, Walker UA, Moyle GJ. Assessment of adipokine expression and mitochondrial toxicity in HIV patients with lipodystrophy on stavudine- and zidovudine-containing regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Dec 15;40(5):565-72.
- Juday T, Gupta S, Grimm K, Wagner S, Kim E. Factors associated with complete adherence to HIV combination antiretroviral therapy. *HIV Clin Trials*. 2011 Mar-Apr;12(2):71-8.

K

- Kakuda TN. Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clin Ther.* 2000 Jun;22(6):685-708.
- Kawakami K, Scheidereit C, Roeder RG. Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul;85(13):4700-4.
- Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res.* 2001 Dec;7(12):4096-101.
- Kelleher T, Cross A, Dunkle L. Relation of peripheral neuropathy to HIV treatment in four randomized clinical trials including didanosine. *Clin Ther.* 1999 Jul;21(7):1182-92.
- Kemper CA, Kent G, Burton S, Deresinski SC. Mexiletine for HIV-infected patients with painful peripheral neuropathy: a double-blind, placebo-controlled, crossover treatment trial. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998 Dec 1;19(4):367-72.
- Kempf DJ, Marsh KC, Denissen JF, McDonald E, Vasavanonda S, Flentge CA, Green BE, Fino L, Park CH, Kong XP, et al. ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 28;92(7):2484-8.
- Keswani SC, Pardo CA, Cherry CL, Hoke A, McArthur JC. HIV-associated sensory neuropathies. *AIDS.* 2002 Nov 8;16(16):2105-17.
- Kino T, De Martino MU, Charmandari E, Ichijo T, Outas T, Chrousos GP. HIV-1 accessory protein Vpr inhibits the effect of insulin on the Foxo subfamily of forkhead transcription factors by interfering with their binding to 14-3-3 proteins: potential clinical implications regarding the insulin resistance of HIV-1-infected patients. *Diabetes.* 2005 Jan;54(1):23-31.
- Kittles RA, Weiss KM. Race, ancestry, and genes: implications for defining disease risk. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2003; 4:33-67.
- Klimkait T, Strebel K, Hoggan MA y cols. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 1990; 64: 621-629.

L

- Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, Bastard JP, Maachi M, Azoulay S, Briggs M, Caron M, Capeau J. Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir Ther.* 2007;12(4):489-500.
- Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance AJ. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein *Science.* 2003 May 16;300(5622):1112 .
- Lee H, Hanes J, Johnson KA. Toxicity of nucleoside analogues used to treat AIDS and the selectivity of the mitochondrial DNA polymerase. *Biochemistry.* 2003 Dec 23;42(50):14711-9.

- Lee GA, Seneviratne T, Noor MA, Lo JC, Schwarz JM, Aweeka FT, Mulligan K, Schambelan M, Grunfeld C. The metabolic effects of lopinavir/ritonavir in HIV-negative men. *AIDS*. 2004 Mar 5;18(4):641-9.
- Lenhard JM, Furfine ES, Jain RG, Ittoop O, Orband-Miller LA, Blanchard SG, Paulik MA & Weiel JE. HIV protease inhibitors block adipogenesis and increase lipolysis *in vitro*. *Antiviral Research* 2000; 47:121–129.
- Levy JA, Ziegler JL. Acquired immunodeficiency syndrome is an opportunistic infection and Kaposi's sarcoma results from secondary immune stimulation. *Lancet*. 1983 Jul 9;2(8341):78-81.
- Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev*. 1993 Mar;57(1):183-289.
- Lewis W, Day BJ, Copeland WC. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Oct;2(10):812-22.
- Lewis W, Kohler JJ, Hosseini SH, Haase CP, Copeland WC, Bienstock RJ, Ludaway T, McNaught J, Russ R, Stuart T, Santoianni R. Antiretroviral nucleosides, deoxynucleotide carrier and mitochondrial DNA: evidence supporting the DNA pol gamma hypothesis. *AIDS*. 2006 Mar 21;20(5):675-84.
- Liao Z, Cimaskasy LM, Hampton R, Nguyen DH, Hildreth JE. Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Jul 20;17(11):1009-19.
- Lo JC, Kazemi MR, Hsue PY, Martin JN, Deeks SG, Schambelan M, Mulligan K. The relationship between nucleoside analogue treatment duration, insulin resistance, and fasting arterialized lactate level in patients with HIV infection. *Clin Infect Dis*. 2005 Nov 1;41(9):1335-40. Epub 2005 Sep 29.
- Löffler M, Fairbanks LD, Zameitat E, Marinaki AM, Simmonds HA. Pyrimidine pathways in health and disease. *Trends Mol Med*. 2005 Sep;11(9):430-7.
- Lori F, Kelly LM, Foli A, Lisiewicz J. Safety of hydroxyurea in the treatment of HIV infection. *Expert Opin Drug Saf*. 2004 Jul;3(4):279-88.
- Lund KC, Wallace KB. Direct effects of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on rat cardiac mitochondrial bioenergetics. *Mitochondrion*. 2004 Jul;4(2-3):193-202.
- Lund KC, Wallace KB. Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)-dependent phosphoregulation of mitochondrial complex I is inhibited by nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Jan 1;226(1):94-106. Epub 2007 Aug 25.
- Lynx MD, LaClair DD, McKee EE. Effects of zidovudine and stavudine on mitochondrial DNA of differentiating 3T3-F442a cells are not associated with imbalanced deoxynucleotide pools. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Mar;53(3):1252-5. doi: 10.1128/AAC.01115-08. Epub 2008 Dec 22.

M

- Maagaard A, Kvale D. Mitochondrial toxicity in HIV-infected patients both off and on antiretroviral treatment: a continuum or distinct underlying mechanisms? *J Antimicrob Chemother*. 2009 Nov;64(5):901-9. doi: 10.1093/jac/dkp316. Epub 2009 Sep 9.

- Maher B, Alfirevic A, Vilar FJ, Wilkins EG, Park BK, Pirmohamed M. TNF-alpha promoter region gene polymorphisms in HIV-positive patients with lipodystrophy. *AIDS*. 2002 Oct 18;16(15):2013-8.
- Mallal SA, John M, Moore CB, James IR, McKinnon EJ. Contribution of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors to subcutaneous fat wasting in patients with HIV infection. *AIDS*. 2000 Jul 7;14(10):1309-16.
- Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, Sayer D, Castley A, Mamotte C, Maxwell D, James I, Christiansen FT. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet*. 2002 Mar 2;359(9308):727-32.
- Mandola MV, Stoehmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, Ladner RD. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res*. 2003 Jun 1;63(11):2898-904.
- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. "Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases" 2010. Churchill Livingstone Elsevier. 7th edición. Pág. 2325-7.
- Manji H. Neuropathy in HIV infection. *Curr Opin Neurol*. 2000 Oct;13(5):589-92.
- Marsh S, Collie-Duguid ES, Li T, Liu X, McLeod HL. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics*. 1999 Jun 15;58(3):310-2.
- Martin JC, Hitchcock MJ, De Clercq E, Prusoff WH. Early nucleoside reverse transcriptase inhibitors for the treatment of HIV: a brief history of stavudine (D4T) and its comparison with other dideoxynucleosides. *Antiviral Res*. 2010 Jan;85(1):34-8. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.006. Epub 2009 Oct 23.
- Martinez E, Mocroft A, García-Viejo MA, Pérez-Cuevas JB, Blanco JL, Mallolas J, Bianchi L, Conget I, Blanch J, Phillips A, Gatell JM. Risk of lipodystrophy in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors: a prospective cohort study. *Lancet*. 2001 Feb 24;357(9256):592-8.
- McIntyre JA, Hopley M, Moodley D, Eklund M, Gray GE, Hall DB, Robinson P, Mayers D, Martinson NA. Efficacy of short-course AZT plus 3TC to reduce nevirapine resistance in the prevention of mother-to-child HIV transmission: a randomized clinical trial. *PLoS Med*. 2009 Oct;6(10):e1000172. doi: 10.1371/journal.pmed.1000172. Epub 2009 Oct 27.
- Meyer UA. Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet*. 2004 Sep;5(9):669-76.
- Miceli MC, Parnes JR. Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Adv Immunol* 1993;53:59-122
- Mills AM, Nelson M, Jayaweera D, Ruxrungtham K, Cassetti I, Girard PM, Workman C, Dierynck I, Sekar V, Abeele CV, Lavreys L. Once-daily darunavir/ritonavir vs. lopinavir/ritonavir in treatment-naive, HIV-1-infected patients: 96-week analysis. *AIDS*. 2009 Aug 24;23(13):1679-88. doi: 10.1097/QAD.0b013e32832d7350.

- Miyasaka T, Tanaka H, Baba M, Hayakawa H, Walker RT, Balzarini J, De Clercq E. A novel lead for specific anti-HIV-1 agents: 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine. *J Med Chem*. 1989 Dec;32(12):2507-9.
- Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW, Broder S. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Oct;82(20):7096-100.
- Mocroft A, Ledergerber B, Katlama C, Kirk O, Reiss P, d'ArminioMonforte A, Knysz B, Dietrich M, Phillips AN, Lundgren JD; EuroSIDA study group. Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet*. 2003 Jul 5;362(9377):22-9.
- Moore RD, Wong WM, Keruly JC, McArthur JC. Incidence of neuropathy in HIV-infected patients on monotherapy versus those on combination therapy with didanosine, stavudine and hydroxyurea. *AIDS*. 2000 Feb 18;14(3):273-8.
- Moore RD, Keruly JC, Chaisson RE. Incidence of pancreatitis in HIV-infected patients receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitor drugs. *AIDS*. 2001 Mar 30;15(5):617-20.
- Moyle G. Clinical manifestations and management of antiretroviral nucleoside analogue-related mitochondrial toxicity. *Clin Ther*. 2000 Aug;22(8):911-36; discussion 898.

N

- Nájera R, Herrera MI, de Andrés R. Human immunodeficiency virus and related retroviruses. *West J Med*. 1987 Dec;147(6):702-8.
- Noble S, Faulds D. Saquinavir. A review of its pharmacology and clinical potential in the management of HIV infection. *Drugs*. 1996 Jul;52(1):93-112

O

- O'Dwyer PJ, Manola J, Valone FH, Ryan LM, Hines JD, Wadler S, Haller DG, Arbuck SG, Weiner LM, Mayer RJ, Benson AB 3rd. Fluorouracil modulation in colorectal cancer: lack of improvement with N - phosphonoacetyl- l -aspartic acid or oral leucovorin or interferon, but enhanced therapeutic index with weekly 24-hour infusion schedule--an Eastern Cooperative Oncology Group/Cancer and Leukemia Group B Study. *J ClinOncol*. 2001 May 1;19(9):2413-21.
- Ofotokun I, Chuck SK, Hitti JE. Antiretroviral pharmacokinetic profile: a review of sex differences. *Gend Med*. 2007 Jun;4(2):106-19.
- Oh J, Hegele RA. HIV-associated dyslipidaemia: pathogenesis and treatment. *Lancet Infect Dis*. 2007 Dec;7(12):787-96.
- Olano JP, Borucki MJ, Wen JW, Haque AK. Massive hepatic steatosis and lactic acidosis in a patient with AIDS who was receiving zidovudine. *Clin Infect Dis*. 1995 Oct;21(4):973-6.

P

- Paice JA, Ferrans CE, Lashley FR, Shott S, Vizgirda V, Pitrak D. Topical capsaicin in the management of HIV-associated peripheral neuropathy. *J Pain Symptom Manage.* 2000 Jan;19(1):45-52.
- Panhard X, Goujard C, Legrand M, Taburet AM, Diquet B, Mentré F; COPHAR 1-ANRS study group. Population pharmacokinetic analysis for nelfinavir and its metabolite M8 in virologically controlled HIV-infected patients on HAART. *Br J Clin Pharmacol.* 2005 Oct;60(4):390-403.
- Panhard X, Legrand M, Taburet AM, Diquet B, Goujard C, Mentré F; Cophar 1 - ANRS 102 Study Group. Population pharmacokinetic analysis of lamivudine, stavudine and zidovudine in controlled HIV-infected patients on HAART. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007 Nov;63(11):1019-29. Epub 2007 Aug 11.
- Périard D, Telenti A, Sudre P, Cheseaux JJ, Halfon P, Reymond MJ, Marcovina SM, Glauser MP, Nicod P, Darioli R, Mooser V. Atherogenic dyslipidemia in HIV-infected individuals treated with protease inhibitors. The Swiss HIV Cohort Study. *Circulation.* 1999 Aug 17;100(7):700-5.
- Peter Turnpenny Sian Ellard. Emery's elements of medical genetics –13th edition Churchill Livingstone Elsevier 2007.
- Phillips E, Mallal S. Successful translation of pharmacogenetics into the clinic: the abacavir example. *Mol Diagn Ther.* 2009;13(1):1-9. doi: 10.2165/01250444-200913010-00001.
- Podzamczar D, Ferrer E, Martínez E, Del Rio L, Rosales J, Curto J, Ribera E, Barrufet P, Llibre JM, Aranda M; ABCDE Study Team. How much fat loss is needed for lipoatrophy to become clinically evident? *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009 Jun;25(6):563-7. doi: 10.1089/aid.2008.0264.
- Pollard RB, Peterson D, Hardy D, Pottage J, Murphy RL, Gathe J, Beall G, Rutkiewicz V, Reynolds L, Cross AP, Dunkle LM. Safety and antiretroviral effects of combined didanosine and stavudine therapy in HIV-infected individuals with CD4 counts of 200 to 500 cells/mm³. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999 Sep 1;22(1):39-48.
- Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 2007 Apr;48(4):751-62. Epub 2007 Jan 2.
- Pfützer RH, Barmada MM, Brunskill AP, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J, Furey WF, Whitcomb DC. SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology.* 2000 Sep;119(3):615-23.

R

- Ranganathan S, Kern PA. The HIV protease inhibitor saquinavir impairs lipid metabolism and glucose transport in cultured adipocytes. *J Endocrinol.* 2002 Jan;172(1):155-62.
- Raza S, Chaudhry NA, Brown JD, Aghaie S, Rezai D, Khan A, Tan Pde L, Berger BJ. To Study the Clinical, Biochemical and Radiological Features of Acute Pancreatitis in HIV and AIDS. *J Clin Med Res.* 2013 Feb;5(1):12-7. doi: 10.4021/jocmr1040w. Epub 2013 Jan 11.

- Ray AS, Olson L, Fridland A. Role of purine nucleoside phosphorylase in interactions between 2',3'-dideoxyinosine and allopurinol, ganciclovir, or tenofovir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Apr;48(4):1089-95.
- Ray AS. Intracellular interactions between nucleos(t)ide inhibitors of HIV reverse transcriptase. *AIDS Rev.* 2005 Apr-Jun;7(2):113-25.
- R. D. 1344/2007, de 11 de octubre, por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano.
- Reeds DN, Mittendorfer B, Patterson BW, Powderly WG, Yarasheski KE, Klein S. Alterations in lipid kinetics in men with HIV-dyslipidemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Sep;285(3):E490-7. Epub 2003 May 13.
- Reisler RB, Murphy RL, Redfield RR, Parker RA. Incidence of pancreatitis in HIV-1-infected individuals enrolled in 20 adult AIDS clinical trials group studies: lessons learned. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005 Jun 1;39(2):159-66.
- Rotger M, Colombo S, Furrer H, Bleiber G, Buclin T, Lee BL, Keiser O, Biollaz J, Décosterd L, Telenti A; Swiss HIV Cohort Study. Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2005 Jan;15(1):1-5.
- Rotger M, Taffe P, Bleiber G, Gunthard HF, Furrer H, Vernazza P, Drechsler H, Bernasconi E, Rickenbach M, Telenti A; Swiss HIV Cohort Study. Gilbert syndrome and the development of antiretroviral therapy-associated hyperbilirubinemia. *J Infect Dis.* 2005 Oct 15;192(8):1381-6. Epub 2005 Sep 9.
- Rückemann K, Fairbanks LD, Carrey EA, Hawrylowicz CM, Richards DF, Kirschbaum B, Simmonds HA. Leflunomide inhibits pyrimidine *de novo* synthesis in mitogen-stimulated T-lymphocytes from healthy humans. *J Biol Chem.* 1998 Aug 21;273(34):21682-91.
- Rudich A, Vanounou S, Riesenber K, Porat M, Tirosh A, Harman-Boehm I, Greenberg AS, Schlaeffer F & Bashan N. The HIV protease inhibitor nelfinavir induces insulin resistance and increases basal lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 2001; 50:1425–1431.

S

- Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, Kleeberger C, Selnes OA, Miller EN, Becker JT, Cohen B, McArthur JC; Multicenter AIDS Cohort Study. HIV-associated neurologic disease incidence changes: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990-1998. *Neurology.* 2001 Jan 23;56(2):257-60.
- Saint-Marc T, Partisani M, Poizot-Martin I, Bruno F, Rouviere O, Lang JM, Gastaut JA, Touraine JL. A syndrome of peripheral fat wasting (lipodystrophy) in patients receiving long-term nucleoside analogue therapy. *AIDS.* 1999 Sep 10;13(13):1659-67.
- Sales SD, Hoggard PG, Sunderland D, Khoo S, Hart CA & Back DJ. Zidovudine phosphorylation and mitochondrial toxicity *in vitro*. *Toxicology & Applied Pharmacology* 2001; 177:54–58.

- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996 Aug 22;382(6593):722-5.
- Sarafianos SG, Marchand B, Das K, Himmel DM, Parniak MA, Hughes SH, Arnold E. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J Mol Biol*. 2009 Jan 23;385(3):693-713.
- Schmitz M, Michl GM, Walli R, Bogner J, Bedynek A, Seidel D, Goebel FD, Demant T. Alterations of apolipoprotein B metabolism in HIV-infected patients with antiretroviral combination therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001 Mar 1;26(3):225-35.
- Schwenk A. Methods of assessing body shape and composition in HIV-associated lipodystrophy. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:9–16.
- Sepkowitz, KA. AIDS- The first 20 years. *N Engl J Med* 2001 Jun 7;344(23):1764-72.
- Shafran SD, Mashinter LD, Roberts SE. The effect of low-dose ritonavir monotherapy on fasting serum lipid concentrations. *HIV Med*. 2005 Nov;6(6):421-5.
- Shlay JC, Chaloner K, Max MB, Flaws B, Reichelderfer P, Wentworth D, Hillman S, Brizz B, Cohn DL. Acupuncture and amitriptyline for pain due to HIV-related peripheral neuropathy: a randomized controlled trial. Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *JAMA*. 1998 Nov 11;280(18):1590-5.
- Simmonds HA. Enzymes of nucleotide biosynthesis: differences between intact and lysed cells as well as between species and tissues can be important. *Biochem Soc Trans*. 1995 Nov;23(4):877-9.
- Simpson DM, Olney R, McArthur JC, Khan A, Godbold J, Ebel-Frommer K. A placebo-controlled trial of lamotrigine for painful HIV-associated neuropathy. *Neurology*. 2000 Jun 13;54(11):2115-9.
- Simpson DM, Haidich AB, Schifitto G, Yiannoutsos CT, Geraci AP, McArthur JC, Katzenstein DA; ACTG 291 study team. Severity of HIV-associated neuropathy is associated with plasma HIV-1 RNA levels. *AIDS*. 2002 Feb 15;16(3):407-12.
- Sluis-Cremer N, Temiz NA, Bahar I. Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding. *Curr HIV Res*. 2004 Oct;2(4):323-32.
- Shahmanesh M, Das S, Stolinski M, Shojaee-Moradie F, Jackson NC, Jefferson W, Cramb R, Nightingale P, Umpleby AM. Antiretroviral treatment reduces very-low-density lipoprotein and intermediate-density lipoprotein apolipoprotein B fractional catabolic rate in human immunodeficiency virus-infected patients with mild dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Feb;90(2):755-60. Epub 2004 Nov 2.
- Small CB, Klein RS, Friedland GH, Moll B, Emeson EE, Spigland I. Community-acquired opportunistic infections and defective cellular immunity in heterosexual drug abusers and homosexual men. *Am J Med*. 1983 Mar;74(3):433-41

- So YT, Holtzman DM, Abrams DI, Olney RK. Peripheral neuropathy associated with acquired immunodeficiency syndrome. Prevalence and clinical features from a population-based survey. *Arch Neurol*. 1988 Sep;45(9):945-8.
- Sonnabend J, Witkin SS, Purtilo DT. Acquired immunodeficiency syndrome, opportunistic infections, and malignancies in male homosexuals. A hypothesis of etiologic factors in pathogenesis. *JAMA*. 1983 May 6;249(17):2370-4.
- Stein DS, Moore KH. Phosphorylation of nucleoside analog antiretrovirals: a review for clinicians. *Pharmacotherapy*. 2001 Jan;21(1):11-34.

T

- Tarr PE, Telenti A. Toxicogenetics of antiretroviral therapy: genetic factors that contribute to metabolic complications. *Antivir Ther*. 2007;12(7):999-1013.
- Thomas FP, Chalk C, Lalonde R, Robitaille Y, Jolicoeur P. Expression of human immunodeficiency virus type 1 in the nervous system of transgenic mice leads to neurological disease. *J Virol*. 1994 Nov;68(11):7099-107.
- Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, Sellitto D, Zeviani M, Carrara F, Carducci C, Leuzzi V, Carelli V, Barboni P, De Negri A, Scozzari R. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet*. 1997 May;60(5):1107-21.
- Tréluyer JM, Morini JP, Dimet J, Gorin I, Rey E, Deleuze J, Ceccaldi PF, Escande JP, Pons G, Dupin N. High concentrations of nelfinavir as an independent risk factor for lipodystrophy in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Dec;46(12):4009-12.
- Trinh BN, Ong CN, Coetzee GA, Yu MC, Laird PW. Thymidylate synthase: a novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels. *Hum Genet*. 2002 Sep;111(3):299-302. Epub 2002 Jul 26.
- Turner SR, Strohbach JW, Tommasi RA, Aristoff PA, Johnson PD, Skulnick HI, Dolak LA, Seest EP, Tomich PK, Bohanon MJ, Horng MM, Lynn JC, Chong KT, Hinshaw RR, Watenpaugh KD, Janakiraman MN, Thaisrivongs S. Tipranavir (PNU-140690): a potent, orally bioavailable nonpeptidic HIV protease inhibitor of the 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone sulfonamide class. *J Med Chem*. 1998 Aug 27;41(18):3467-76.

U

- UNAIDS Report on the global AIDS epidemic | 2012.
http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_with_annexes_en.pdf

V

- van Leth F, Phanuphak P, Stroes E, Gazzard B, Cahn P, Raffi F, Wood R, Bloch M, Katlama C, Kastelein JJ, Schechter M, Murphy RL, Horban A, Hall DB, Lange JM, Reiss P. Nevirapine and efavirenz elicit different changes in lipid profiles in antiretroviral-therapy-naive patients infected with HIV-1. *PLoS Med.* 2004 Oct;1(1):e19. Epub 2004 Oct 19.
- Vela JE, Miller MD, Rhodes GR, Ray AS. Effect of nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitors of HIV on endogenous nucleotide pools. *Antivir Ther* 2008; 13:789–797.
- Veloso S, Olona M, Peraire J, Viladés C, Pardo P, Domingo P, Asensi V, Broch M, Aguilar C, López-Dupla M, Aragonés G, Garcia-Pardo G, Sirvent JJ, Vendrell J, Richart C, Vidal F; Hiv Lipodystrophy Study Group. No relationship between TNF- α genetic variants and combination antiretroviral therapy-related lipodystrophy syndrome in HIV type 1-infected patients: a case-control study and a meta-analysis. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011 Feb;27(2):143-52. doi: 10.1089/aid.2009.0312. Epub 2010 Sep 20.
- Villarroya F, Domingo P, Giral M. Drug-induced lipotoxicity: lipodystrophy associated with HIV-1 infection and antiretroviral treatment. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Mar;1801(3):392-9. doi: 10.1016/j.bbali.2009.09.018. Epub 2009 Sep 30.

W

- Walker UA, Bickel M, Lütke Volksbeck SI, Ketelsen UP, Schöfer H, Setzer B, Venhoff N, Rickerts V, Staszewski S. Evidence of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor--associated genetic and structural defects of mitochondria in adipose tissue of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002 Feb 1;29(2):117-21.
- Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science.* 1992 May 1;256(5057):628-32.
- Wang J, Sönnnerborg A, Rane A, Josephson F, Lundgren S, Ståhle L, Ingelman-Sundberg M. Identification of a novel specific CYP2B6 allele in Africans causing impaired metabolism of the HIV drug efavirenz. *Pharmacogenet Genomics.* 2006 Mar;16(3):191-8.
- Wang HG, Wang JL, Zhang J, Zhao LX, Zhai GX, Xiang YZ, Chang P. Reduced folate carrier A80G polymorphism and susceptibility to neural tube defects: a meta-analysis. *Gene.* 2012 Dec 1;510(2):180-4
- Weiss SH, Goedert JJ, Sarngadharan MG, Bodner AJ, Gallo RC, Blattner WA. Screening test for HTLV-III (AIDS agent) antibodies. Specificity, sensitivity, and applications. *JAMA.* 1985 Jan 11;253(2):221-5.
- Whitcomb DC. Acute pancreatitis. *N Engl J Med* 2006;354(20):2142-2050.
- Wierzbicki AS, Purdon SD, Hardman TC, Kulasegaram R, Peters BS. HIV lipodystrophy and its metabolic consequences: implications for clinical practice. *Curr Med Res Opin.* 2008 Mar;24(3):609-24. doi: 10.1185/030079908X272742.
- Woolley I, Faragher M, Ugoni A, Spelman D. An analysis of factors associated with HIV-related peripheral neuropathy. *Neurological Infections Epidemiol* 1993;1997:33–7.

Y

- Yamanaka H, Gatanaga H, Kosalaraksa P, Matsuoka-Aizawa S, Takahashi T, Kimura S, Oka S. Novel mutation of human DNA polymerase gamma associated with mitochondrial toxicity induced by anti-HIV treatment. *J Infect Dis.* 2007 May 15;195(10):1419-25. Epub 2007 Apr 4.
- Yang OO, Nguyen PT, Kalams SA, Dorfman T, Göttlinger HG, Stewart S, Chen IS, Threlkeld S, Walker BD. Nef-mediated resistance of human immunodeficiency virus type 1 to antiviral cytotoxic T lymphocytes. *J Virol.* 2002 Feb;76(4):1626-31.] .

Z

- Zangerle R, Sarcletti M, Gallati H, Reibnegger G, Wachter H, Fuchs D. Decreased plasma concentrations of HDL cholesterol in HIV-infected individuals are associated with immune activation. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1994 Nov;7(11):1149-56.
- Zhang B, MacNaul K, Szalkowski D, Li ZH, Berger J & Moller DE. Inhibition of adipocyte differentiation by HIV protease inhibitors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999; 84:4274–4277.