



LIPODISTRÒFIA EN PACIENTS INFECTATS PEL VIH TRACTATS AMB FÀRMACS ANTIRETROVIRALS: DETERMINANTS GENÈTICS I MOLECULARS.

Maria Saumoy Linares

Dipòsit Legal: T 275-2015

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

Departament de Medicina i Cirurgia

**LIPODISTRÒFIA EN PACIENTS INFECTATS PEL VIH
TRACTATS AMB FÀRMACS ANTIRETROVIRALS:
DETERMINANTS GENÈTICS I MOLECULARS**



MARIA SAUMOY I LINARES

Tesi Doctoral

2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LIPODISTRÒFIA EN PACIENTS INFECTATS PEL VIH TRACTATS AMB FÀRMACS ANTIRETROVIRALS:

DETERMINANTS GENÈTICS I MOLECULARS.

Maria Saumoy Linares

Dipòsit Legal: T 275-2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
Departament de Medicina i Cirurgia



LIPODISTRÒFIA EN PACIENTS INFECTATS PEL VIH
TRACTATS AMB FÀRMACS ANTIRETROVIRALS:
DETERMINANTS GENÈTICS I MOLECULARS

Memòria presentada per Maria Saumoy i Linares, per aspirar al grau de
Doctora en Medicina

Treball realitzat sota la direcció dels Drs. Francesc Vidal i Marsal,
Joaquim Peraire i Forner i Consuelo Viladés i Laborda

Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII

Tarragona, juny de 2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LIPODISTRÒFIA EN PACIENTS INFECTATS PEL VIH TRACTATS AMB FÀRMACS ANTIRETROVIRALS:

DETERMINANTS GENÈTICS I MOLECULARS.

Maria Saumoy Linares

Dipòsit Legal: T 275-2015

Francesc Vidal i Marsal, Cap Clínic del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Joan XXIII de Tarragona i Catedràtic de Medicina de la Universitat Rovira i Virgili; Joaquim Peraire i Forner, Metge Adjunt del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII i Professor Associat Mèdic de la Universitat Rovira i Virgili; i Consuelo Viladés i Laborda, Metgessa Adjunta del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII i Professora Associada Mèdica de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFIQUEN QUE:

La Tesi Doctoral titulada “Lipodistròfia en pacients infectats pel VIH tractats amb fàrmacs antiretrovirals: determinants genètics i moleculars”, presentada per Maria Saumoy i Linares, ha estat realitzada sota la nostra direcció i compleix els requisits necessaris per optar al títol de Doctor en Medicina.

I perquè així consti i tingui els efectes oportuns, firmem el present document.

Tarragona, 3 de juny de 2010

Francesc Vidal

Joaquim Peraire

Consuelo Viladés

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LIPODISTRÒFIA EN PACIENTS INFECTATS PEL VIH TRACTATS AMB FÀRMACS ANTIRETROVIRALS:

DETERMINANTS GENÈTICS I MOLECULARS.

Maria Saumoy Linares

Dipòsit Legal: T 275-2015

DEDICAT

Al Joan i als nostres fills, la Núria, l'Anna i
el Lluís per omplir la meva vida d'alegria i
amor

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LIPODISTRÒFIA EN PACIENTS INFECTATS PEL VIH TRACTATS AMB FÀRMACS ANTIRETROVIRALS:

DETERMINANTS GENÈTICS I MOLECULARS.

Maria Saumoy Linares

Dipòsit Legal: T 275-2015

AGRAÏMENTS

Al Prof. Dr. Francesc Vidal, per ser una font contínua d'aprenentatge i un model a seguir. Amb la teva ajuda i estímul el treball ha donat els seus fruits.

Als codirectors de la tesi, Drs. Joaquim Peraire i Consuelo Viladés, amb els que he vist els primers malalts de VIH i m'heu ensenyat els fonaments del món del VIH.

Als companys de Medicina Interna de l'Hospital Joan XXIII, especialment a la Dra. Teresa Auguet per la dedicació, amiatat i exemple a seguir com a metge; Dr. Miguel Lopez-Dupla per la seva ajuda en l'estadística i Sergi Veloso pels seus ensenyaments en el món del VIH.

Al Dr. Cristòbal Richart i al Dr. Joan Vendrell per ajudar-me a obtenir el Contracte Post Formació MIR que m'ha permès poder realitzar els treballs de la present tesi.

Als companys de laboratori, Montserrat Broch, Matilde Rodríguez, Mercé Miranda, Carmen Aguilar, la vostra feina és imprescindible en aquesta tesi.

Als meus companys de treball actuals, els Drs. Daniel Podzamczer, Elena Ferrer, Juan Manuel Tiraboschi, Arkaitz Imaz i tots els companys del Servei de Malalties Infeccioses de l'Hospital de Bellvitge, amb els que continuo dia a dia aprenent i disfrutant de la nostra professió.

Al Dr. Pere Domingo i Mar Gutiérrez de l'Hospital Sant Pau de Barcelona i Carlos Alonso-Villaverde i Blai Coll de l'Hospital Sant Joan de Reus per la seva col·laboració en els treballs de la present tesi.

Un agraïment molt especial als nostres pacients, per participar d'una manera desinteressada i sincera en els nostres estudis.

Als meus pares, sempre m'heu recolzat i heu estat al meu costat.

Aquesta Tesi Doctoral ha estat parcialment finançada amb recursos obtinguts per a projectes de recerca finançats per l'Instituto de Salud Carlos III (PI02/1280, PI05/1591 i PI07/076), per la Fundación Para la Investigación y Prevención del Sida en España [FIPSE] (06/36610) i per la Red de Investigación de Sida (RD06/0006/1004).

ÍNDEX

ABREVIATURES

INTRODUCCIÓ

1. Importància de l'epidèmia pel VIH.....	3
2. Etiopatogènia de la infecció per VIH	
2.1 Estructura del VIH	4
2.2 Cicle biològic del VIH.....	6
2.3 Processos patogènics induïts pel VIH.....	8
3. Tractament antiretroviral de gran activitat	
3.1. Antecedents històrics.....	9
3.2 Fàrmacs antiretrovirals.....	10
3.3 Quan i com iniciar tractament antiretroviral.....	12
3.4 Efectes adversos dels fàrmacs antiretrovirals.....	13
4. Lipodistròfia associada al VIH/TARGA	
4.1 Definició.....	15
4.2 Prevalença i factors de risc.....	16
4.3 Diagnòstic.....	17
4.4 Etiopatogènia.....	18
4.4.1 El teixit adipós.....	18
4.4.2 Alteració de la diferenciació adipocitària.....	21
4.4.3 Adipocitoquines.....	22
4.4.4 Toxicitat mitocondrial.....	25
4.4.5 Efectes directes del TARGA.....	26

4.4.6 Factors del propi VIH.....	27
4.4.7 Inflamació crònica.....	27
4.4.8 Visió global.....	27
5. Farmacogenètica de la lipodistròfia i les alteracions metabòliques associades al TARGA.....	29
6. Lipina	
6.1 Funcions.....	34
6.2 Estudis en humans.....	34
6.3 Estudis en pacients amb infecció pel VIH.....	35
7. Interleuquina-6	
7.1 Funcions.....	35
7.2 Estudis en humans no infectats pel VIH.....	36
7.3 Estudis en pacients amb infecció pel VIH.....	36
7.4 Associació entre el polimorfisme -174G>C de la IL-6 i alteracions metabòliques.....	36
8. PPAR γ	
8.1 Funcions.....	37
8.2 Estudis en pacients amb infecció pel VIH	38
8.3 Associació entre el polimorfismes del <i>PPARγ</i> i alteracions metabòliques.....	38
HIPÒTESIS I OBJECTIUS	
Estudi 1: Lipina.....	43
Estudi 2: Interleuquina-6.....	44

Estudi 3: PPARγ	45
--	-----------

PUBLICACIONS

Estudi 1: Lipina	49
-------------------------------	-----------

Estudi 2: Interleuqina-6	59
---------------------------------------	-----------

Estudi 3: PPARγ	64
--	-----------

DISCUSSIÓ

Estudi 1: Lipina	75
-------------------------------	-----------

Estudi 2: Interleuqina-6	77
---------------------------------------	-----------

Estudi 3: PPARγ	79
--	-----------

CONCLUSIONS	83
--------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA	87
---------------------------	-----------

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LIPODISTRÒFIA EN PACIENTS INFECTATS PEL VIH TRACTATS AMB FÀRMACS ANTIRETROVIRALS:

DETERMINANTS GENÈTICS I MOLECULARS.

Maria Saumoy Linares

Dipòsit Legal: T 275-2015

ABREVIATURES

ABC	Abacavir
ABCA1	ABC transporter A1
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADNmt	Àcid desoxiribonucleic mitocondrial
A-FABP 4	Proteïna d'adipòcits unida a àcid gras
Apo	Apolipoproteïna
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
ASP	Proteïna estimuladora de l'acetilació
ATZ	Atazanavir
AZT	Zidovudina
FPV	Fosamprenavir
FTC	Emtricitabina
GLUT 4	Transportador de glucosa 4
GWAS	Whole Genome Association Studies
HDL	Lipoproteïna d'alta densitat
ICAM-1	Molècula d'adhesió intercel·lular-1
IDV	Indinavir
IGF-1	Factor de creixement insulin like-1
IL	Interleuquina
INTI	Inhibidor nucleòsid de la transcriptassa inversa
INNTI	Inhibidor no nucleòsid de la transcriptassa inversa
IP	Inhibidor de la proteassa
LD	Lipodistròfia
LDL	Lipoproteïna de baixa densitat
LIPG	Gen de la lipassa endotelial
LPL	Lipoproteïna lipassa
LPV	Lopinavir
MCP-1	Proteïna quimioatracció de macròfags
MIF	Factor inhibidor de macròfags
MVC	Maraviroc
NFV	Nelfinavir
NVP	Nevirapina
PAI-1	Inhibidor de l'activador del plasminogen
PNS	Polimorfisme de nucleòtid simple
PPARγ	Peroxisome proliferators-activated receptor gamma
RBP4	Proteïna unida a retinol 4
RI	Resistència a la insulina
ROS	Espècies d'oxigen reactives
RTG	Raltegravir
RTV	Ritonavir
SAA	Sèrum amiloide A
SI	Sensibilitat a la insulina
SIDA	Síndrome d'immunodeficiència adquirida
SQV	Saquinavir
SREBP-1	Sterol-regulatory-element-binding-protein-1
TARGA	Tractament antiretroviral de gran activitat
TZD	Tiazolidinediones

3TC	Lamivudina
TDF	Tenofovir
TG	Triglicèrid
TGFβ	Factor de creixement- β transformador
TI	Transcriptassa inversa
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR1 i 2	Receptors solubles de TNF- α 1 i 2
VHC	Virus hepatitis C
VIH	Virus de la immunodeficiència humana

INTRODUCCIÓ

1. IMPORTÀNCIA DE L'EPIDÈMIA PEL VIH

L'any 1981 es van diagnosticar els primers casos de síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA) als Estats Units i el 1983 es va aïllar el virus de la immunodeficiència humana (VIH) a partir de teixit limfàtic d'un pacient infectat (1). Desde aleshores la infecció pel VIH s'ha extès de manera exponencial per tot el món i suposa una pandèmia amb importants repercussions socials i econòmiques. Més de 60 milions de persones s'han infectat pel virus i ha arribat a representar una de les causes més importants de mort en tot el món, especialment en països en desenvolupament. Mercè als importants avenços en els camps de la prevenció i del tractament, en molts països l'epidèmia s'ha estabilitzat (Figura 1), tot i que en determinades zones d'Àsia i països de l'ex-Unió Soviètica encara s'observa un increment important de la incidència de nous casos d'infecció pel VIH. L'any 2008 s'estimava que uns 33.4 milions de persones estaven infectades pel VIH, 2.57 milions de persones es van infectar i 2.0 milions de persones van morir de SIDA en tot el món. A l'Àfrica es concentra el 67% del pacients infectats pel VIH i el 72% de les morts de SIDA a nivell mundial (2). A Catalunya tant la incidència de nous casos de SIDA com el número de morts per SIDA ha disminuït progressivament desde 1995, com mostra la figura 2 (3).

Figura 1. Dades epidemiològiques de la infecció pel VIH a nivell mundial (extret de: ONUSIDA 2009)

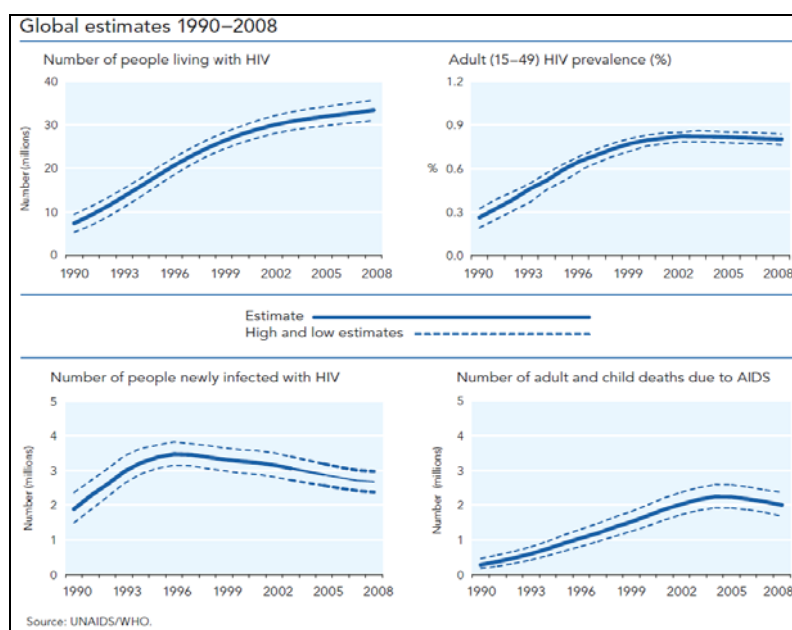
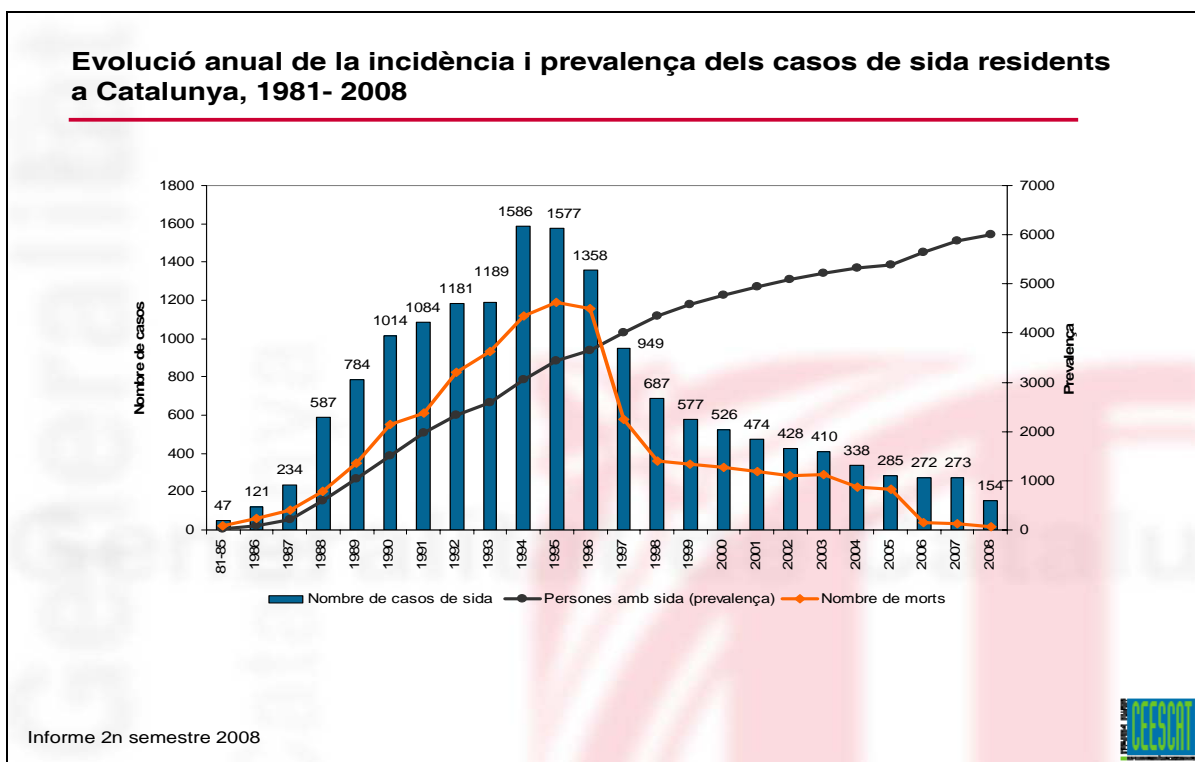


Figura 2. Evolució anual de la incidència i prevalença de casos de SIDA a Catalunya (extret CEESCAT 2009).



2. ETIOPATOGENIA DE LA INFECCIÓ PEL VIH

2.1. Estructura del VIH

El VIH és un virus que pertany a la família *Retroviridae*. La principal característica d'aquesta família és que conté un enzim anomenat transcriptassa inversa (TI) capaç de sintetitzar àcid desoxiribonucleic (ADN) proviral a partir de l'àcid ribonucleic (ARN) viral en la cèl·lula hoste (4).

El VIH

El VIH és una partícula esfèrica de 80 a 100 nm de diàmetre (Figura 3). Està formada per les següents estructures:

- Envoltura lipídica-proteica: bicapa lipídica que prové de la cèl·lula hoste on s'inserten les glicoproteïnes transmembrana virals gp120 i gp41 mediadors de la interacció virus-cèl·lula hoste i antigens d'histocompatibilitat I i II de la cèl·lula hoste.
- Matriu: formada per la proteïna p17
- Càpsida: formada per la proteïna p24
- Nucleocàpsida: conté el genoma del virus que està constituït per ARN, nucleoproteïnes i enzims virals (retrotranscriptassa, proteassa, integrassa)

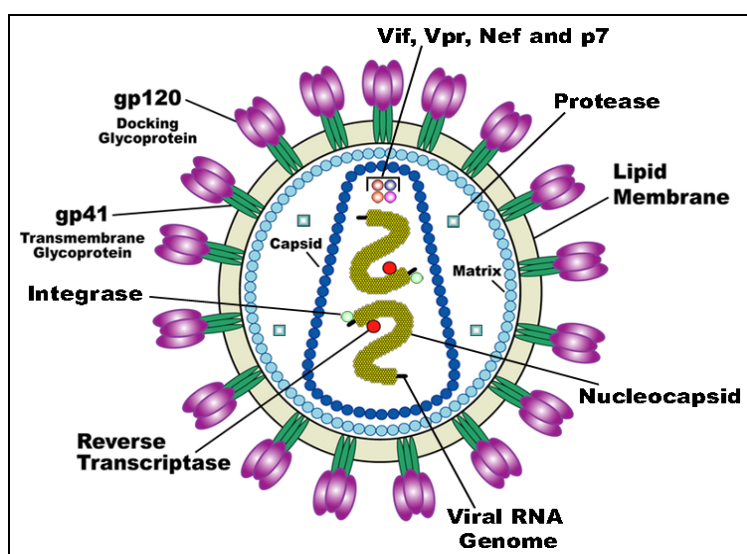
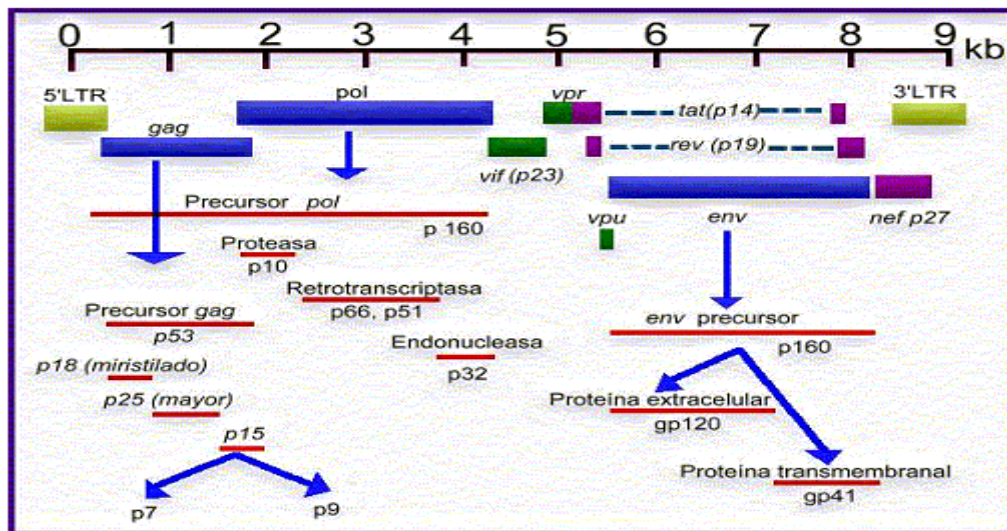


Figura 3. Estructura del VIH (extret de: US National Institutes of Health)

Genoma viral

El genoma del VIH està constituït per dues còpies d'ARN monocatenàries de polaritat positiva, de 9.6 kilobases de longitud (Figura 4). Està format per nou gens, tres dels quals codifiquen per a proteïnes estructurals (gens *gag*, *pol* i *env*), dos codifiquen per a proteïnes reguladores (gens *tat* i *rev*) i quatre ho fan per a proteïnes accessòries (gens *vpu*, *vpr*, *vif* i *nef*). El gen *gag* codifica per a les proteïnes estructurals de la matriu, la càpsida i la nucleocàpsida. El gen *pol* codifica pels enzims virals: proteassa, transcriptassa inversa, integrassa i ARNassa. El gen *env* codifica per a les glicoproteïnes de l'embolcall: gp41 i gp120. Les proteïnes reguladores i accessòries són molt importants ja que controlen l'expressió vírica, la infectivitat i la interacció virus-cèl·lula (4).

Figura 4. Genoma del VIH i proteïnes que codifica.



(Fuente: ejb.ucv.cl/.../Asparchivos/capitulo011fig.htm)

2.2. Cicle biològic del VIH

El cicle biològic del VIH s'esquematitza a la Figura 5 i es divideix en dues fases (4,5):

- Fase inicial: entrada del virus a la cèl·lula hoste i culmina amb la integració del ADN viral en el genoma de la cèl·lula hoste.
- Fase tardana: inclou la transcripció del genoma viral, la síntesi i processament de proteïnes, el seu ensamblatge i la sortida dels nous virus.

El seu coneixement ha permès el desenvolupament d'un ampli arsenal terapèutic pel tractament de la infecció pel VIH (5).

A continuació es descriuen les diferents fases del cicle biològic del VIH.

A) Fase inicial

- **Entrada del VIH a la cèl·lula hoste:** es realitza mitjançant la unió de la gp120 del VIH amb el receptor CD4 de la cèl·lula hoste. Aquest fet provoca un canvi conformacional que permet la interacció amb els correceptors CCR5 i/o CXCR4. A resultes d'això, la gp41 és exposada i es produeix la interacció del pèptid de fusió amb la membrana cel·lular i posterior fusió de la membrana viral i la membrana de la cèl·lula hoste amb la internalització de la càpsida.

- **Transcripció inversa:** consisteix en la síntesi d'una doble cadena d'ADN (ADN proviral) a partir de l'ARN viral mitjançant la TI. És necessari que la cèl·lula hoste estigui activada en la fase G1 del cicle cel·lular.

- **Integració:** l'ADN proviral constituït s'uneix a factors virals i cel·lulars formant el complex de preintegració. Aquest és transportat al nucli cel·lular on s'integra al genoma de la cèl·lula hoste mitjançant la integrassa, constituint la forma proviral del VIH. El virus es pot mantenir en estat latent, replicar de manera controlada o iniciar una replicació massiva amb la lisi de la cèl·lula hoste.

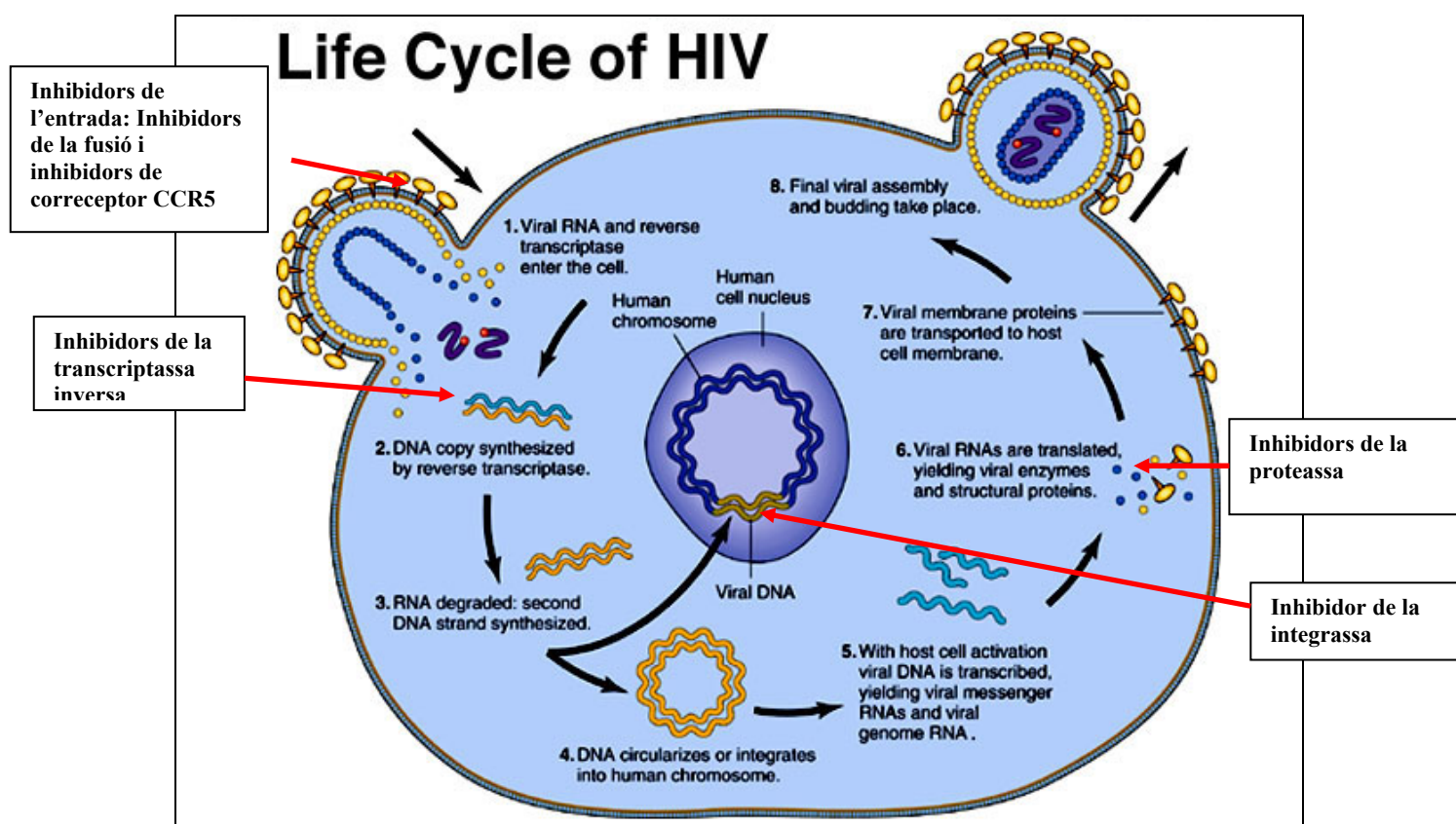
B) Fase tardana

- **Transcripció del genoma viral:** consisteix en la transcripció de l'ADN proviral en ARN missatger (ARNm). Aquest pas depèn d'una sèrie de factors cel·lulars, essent el més important el factor NF-kB, complex que està activat en els limfòcits actius (6). Altres factors cel·lulars associats a l'estat de latència són la proteïna Murr-1 i l'APOBC3G, aquest darrer és un factor de restricció cel·lular que no permet la replicació viral (7).

- **Transport i traducció:** L'ARNm és transportat al citoplasma. Als ribosomes de la cèl·lula hoste té lloc la traducció de l'ARNm, sintetitzant-se les proteïnes virals. La proteïna viral Rev intervé en aquest procés.

- **Processament de proteïnes, ensamblatge i sortida dels nous virus:** en el processament de les proteïnes virals intervien la proteasa viral i les proteïnes Vif i Vpu. La maduració final dels virions i l'ensamblatge correcte de les proteïnes es produirà durant el procés de gemació del virus a través de la membrana cel·lular, formant-se una partícula viral madura. En aquesta fase intervien diversos factors cel·lulars (8).

Figura 5. Cicle biològic del VIH i enzims diana de les famílies de fàrmacs antiretrovirals (extret de: Byer/Shalberg/Galliano Dimensions of Human Sexuality. 5º Copyright 1999).



2.3. Processos patològics induïts pel VIH

El VIH penetra en les cèl·lules que en la seva superfície expressen el receptor CD4 i que són majoritàriament els limfòcits T col·laboradors i les cèl·lules del sistema mononuclear-fagocític. La principal conseqüència de la infecció pel VIH és la destrucció dels limfòcits CD4, fet que provoca una limfopènia progressiva i greu que serà la responsable de les infeccions oportunistes que acabaran patint els pacients. La limfopènia es produeix en gran part per la destrucció directa del limfòcits CD4 durant la replicació viral. Altres mecanismes indirectes de limfopènia serien: mecanismes immunitaris, apoptosi per acció de proteïnes virals, bloqueig en la regeneració limfocitària, alteracions en la redistribució limfocitària i hiperactivació i esgotament del sistema immune.

La resposta immunitària que provoca la infecció pel VIH és humoral i cel·lular. La resposta humoral, malgrat ser intensa, té una escassa capacitat neutralitzant. La resposta cel·lular és duta a

terme pels limfòcits T col·laboradors i limfòcits CD8 citotòxics i esdevé essencial per contenir la replicació viral en els estadis inicials de la malaltia. Ambdós tipus de resposta acaben claudicant en fases avançades de la infecció, produint-se una davallada massiva del sistema immune degut a una replicació viral accelerada (9).

3. TRACTAMENT ANTIRETROVIRAL DE GRAN ACTIVITAT (TARGA)

3.1. Antecedents històrics

El 1987 es va començar a utilitzar el primer fàrmac antiretroviral per a tractar la infecció pel VIH, la zidovudina (AZT), un inhibidor nucleòsid de la transcriptassa inversa (INTI) (10). Aquest fàrmac (i tots els membres de la família) actua bloquejant la transformació de ARN viral en ADN proviral (11). El tractament de la infecció pel VIH amb un sol fàrmac (monoteràpia), aviat es va mostrar com a poc eficaç per al tractament de la infecció crònica. Pocs anys més tard es va poder disposar de més antiretrovirals: didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), estavudina (d4T) i lamivudina (3TC), tots pertanyents a la mateixa família que l'AZT. En aquesta època (1990-1995), l'estàndar del tractament antirretroviral consistia en la utilització de dos d'aquests fàrmacs (biteràpia). Si bé durant els primers mesos de tractament la resposta a la biteràpia fou millor que a la monoteràpia, la majoria de pacients acabaven presentant un fracàs terapèutic (12). L'any 1996 es comença a poder disposar de saquinavir, el primer membre d'una nova família de fàrmacs antiretrovirals, anomenada inhibidors de la proteassa (IP). El seu mecanisme d'acció és el bloqueig de la formació de noves partícules de VIH infeccioses en la cèl·lula infectada a l'inhibir l'acció de la proteassa del VIH (13). Mitjançant l'addició d'un IP a la combinació de dos inhibidors de la transcriptassa inversa es va poder oferir per primera vegada als pacients amb infecció pel VIH un tractament realment efectiu i aquest fet ha canviat de manera dràstica la història natural de malaltia. Aquest esquema terapèutic, anomenat tractament antiretroviral de gran activitat (TARGA) va permetre un important augment de la supervivència i una disminució del risc d'infeccions oportunistes (14). Posteriorment s'han afegit a aquest arsenal terapèutic altres famílies d'antiretrovirals, com els

inhibidors de l'entrada (15) i els inhibidors de la integrassa (16). Amb el TARGA s'aconsegueix una supressió de la replicació viral sostinguda en la majoria de pacients tractats, però no la seva eliminació, pel que avui en dia, la seva administració ha de ser contínua i de per vida (17). L'objectiu del TARGA és suprimir al màxim la replicació del VIH amb la finalitat de permetre que el sistema immune no només deixi de deteriorar-se, sinó que es recuperi.

Dos aspectes de gran importància, que poden limitar l'eficàcia del TARGA a llarg termini, són la toxicitat i l'aparició de resistència als fàrmacs. La toxicitat serà detallada més endavant. La resistència als fàrmacs antiretrovirals que apareix en els curs d'un tractament és degut a la combinació de 2 factors: per un costat la manca de supressió virològica sota un tractament farmacològic (per mala adherència, baixa potència del tractament, interaccions farmacològiques...), i per un altre la gran variabilitat genètica del virus. Aquesta és deguda a l'alta taxa d'error de la TI i a l'extraordinària taxa de replicació del virus (de l'ordre de 10^{10} cada dia). En aquesta situació poden aparèixer a l'atzar mutacions en els gens que codifiquen per a les proteïnes de les dianes terapèutiques que interfereixen amb l'acció del fàrmac i, si s'administra el fàrmac antiretroviral, pot tenir lloc la selecció de la variant mutada, que amb el temps pot arribar a constituir-se com la població majoritària de l'hoste (18).

3.2. Fàrmacs antiretrovirals

En l'actualitat disposem de 24 fàrmacs antiretrovirals comercialitzats agrupats en 5 famílies que actuen en les diferents fases del cicle biològic del VIH (5). A la Taula 1 estan reflectits, agrupats per famílies i dianes terapèutiques.

Inhibidors nucleòsids/nucleòtids de la transcriptassa inversa (INTI)

El mecanisme d'acció comú a tots ells és competir amb els nucleòsids naturals en la seva incorporació a la cadena d'ADN viral. Una vegada s'incorporen a la cadena d'ADN, donat que no tenen el grup 3'hidroxil en la seva ribosa, es produeix una finalització precoç de la seva extensió. Requereixen ser fosforilats en el citoplasma de la cèl·lula per ser actius (11).

Inhibidors no nucleòsids de la transcriptassa inversa (INNTI)

Aquests fàrmacs s'uneixen a la TI en un lloc proper al centre catalític de l'enzim, i provoquen un canvi conformacional en l'enzim que redueix la seva activitat enzimàtica (19).

Inhibidors de la proteassa (IP)

Actuen bloquejant l'escisió de les poliproteïnes gag i pol, de tal manera que es generen partícules virals immadures i sense capacitat infectiva (20).

Inhibidors de l'entrada

Actualment n'hi ha de dos tipus disponibles:

- Inhibidor de la fusió: l'enfuvirtide és un pèptid que s'uneix al domini HR1 de la gp41 de l'envoltura del VIH, interferint en el seu canvi de conformació i impeding la fusió entre la membrana viral i la cel·lular (16).
- Inhibidor del coreceptor CCR5: el maraviroc és un inhibidor selectiu del coreceptor CCR5 que actua bloquejant la fusió del VIH a la membrana cel·lular (21)

Inhibidors de la integrassa

El raltegravir actua inhibint l'activitat catalítica de la integrassa viral evitant la inserció covalent o integració del genoma viral al genoma de la cèl·lula hoste (16).

Taula 1. Fàrmacs antiretrovirals disponibles actualment.

<i>Inhibidors de la transcriptassa inversa</i>		<i>Inhibidors de la proteassa</i>	<i>Inhibidors de l'entrada</i>	<i>Inhibidors de la integrassa</i>
<u>Anàlegs de nucleòsids</u>	<u>No Anàlegs de nucleòsids</u>			
Zidovudina(AZT) Lamivudina (3TC) Emtricitabina (FTC) Didanosina (ddI) Estavudina(d4T) Abacavir(ABC) Tenofovir (TDF) Zalcitabina (ddC)	Nevirapina (NVP) Efavirenz (EFV) Etravirina (ETR) Delavirdina (DLV)	Saquinavir (SQV) Ritonavir (RTV) Indinavir (IDV) Nelfinavir (NFV) Lopinavir (LPV) Atazanavir (ATZ) Fosamprenavir (FPV) Tripanavir (TPV) Darunavir (DRV)	Enfuvirtide (ENF) Maraviroc (MVC)	Raltegravir (RTG)

3.3. Quan i com iniciar tractament antiretroviral

Les guies clíniques actualment vigents recomanen iniciar TARGA en els pacients simptomàtics i en aquells pacients asimptomàtics que tenen una xifra de limfòcits CD4 <350 cèl/μl. Quan la xifra de limfòcits està entre 350-500 cèl/μl es recomana iniciar tractament en les següents situacions: cirrosi hepàtica, hepatitis crònica per VHC, hepatitis B amb indicació de tractament, càrrega viral plasmàtica >10⁵ còpies/ml, proporció de CD4 <14%, edat >55 anys, risc cardiovascular elevat i nefropatia. Quan la xifra de limfòcits és >500 cèl/μl en general es recomana diferir l'inici del tractament, tot i que es pot considerar en les mateixes situacions que els pacients amb 350-500 cèl/μl. (22-24).

El TARGA actual d'inici consisteix en una combinació diària de 3 ó 4 fàrmacs, generalment dos INTI i, o bé un IP potenciat amb ritonavir (IP/r), o bé un INNTI. Existeixen unes combinacions d'elecció, definides en les diferents guies terapèutiques, en funció de l'eficàcia, efectes adversos i comoditat d'administració (Taula 2). Ademés alhora d'escollir una pauta de tractament també s'haurà de tenir en compte la comorbilitat del pacient i els costos dels fàrmacs (22-24).

Taula 2. Pautes preferents i alternatives per l'inici de TARGA en pacients naïve. (extret de la referència 22). El TARGA es basa en la combinació d'un fàrmac de la columna A, B i C.

	PAUTES		
	A	B	C
<u>Pautes preferents</u>	Tenofovir Abacavir	Lamivudina Emtricitabina	Efavirenz-Nevirapina Atazanavir/ritonavir QD Darunavir/ritonavir QD Lopinavir/ritonavir BID o QD Fosamprenavir/ritonavir BID Saquinavir/ritonavir BID Raltegravir
<u>Pautes alternatives</u>	Zidovudina Didanosina		Fosamprenavir/ritonavir QD Atazanavir Fosamprenavir

QD: una vegada/dia; BID: 2 vegades/dia.

3.4. Efectes adversos dels fàrmacs antiretrovirals

Els fàrmacs antiretrovirals s'associen a efectes adversos que poden presentar-se de forma aguda, els primers dies o setmanes, o presentar-se a mitjà-llarg termini, després de mesos o anys de l'inici del seu consum. Els efectes adversos també es poden classificar com a fàrmac-específics o grup-específics (Taula 3).

Taula 3. Efectes adversos més freqüents dels fàrmacs antiretrovirals.

<i>Fàrmacs</i>	<i>Efectes adversos fàrmac- específics</i>	<i>Efectes adversos grup- específics</i>
<u>INTI</u> Zidovudina Lamivudina Emtricitabina Didanosina Estavudina Abacavir Tenofovir	Mielotoxicitat (anèmia i neutropènia), cefalea, intolerància GI Neuropatia perifèrica, toxicitat GI, hepatotoxicitat, pancreatitis, hiperuricèmia Neuropatia perifèrica Reacció d'hipersensibilitat Nefropatia tubular, insuficiència renal	Toxicitat mitocondrial Lipodistròfia
<u>INNTI</u> Nevirapina Efavirenz Etravirina	Síntomes neuropsiquiàtrics	Hepatitis Exantema cutani
<u>IP</u> Saquinavir Ritonavir Indinavir Nelfinavir Lopinavir Atazanavir Fosamprenavir Tripanavir Darunavir	Augment de transaminases Diarrea Nefrolitiasis, hiperbilirrubinèmia Diarrea Diarrea Hiperbilirrubinèmia Exantema cutani, diarrea Diarrea, alteracions del SNC (vertígen, dificultat de concentració, enlentiment, canvis d'humor) Exantema cutani	Intolerància GI Dislipèmia Resistència a la insulina Lipodistròfia Possible augment de sagnat en hemofílics
<u>Enfuvirtide</u>	Reaccions locals lleu-moderades en el lloc d'injecció	
<u>Maraviroc</u>	Intolerància GI, parestèsia, disgèusia, erupció cutània, astènia.	
<u>Raltegravir</u>	Diarrea, nàusees, cefalea	

INTI: inhibidors nucleòsids de la transcriptassa inversa. INNTI: inhibidors no nucleòsids de la transcriptassa inversa. IP: inhibidors de la proteassa. Intolerància GI: intolerància gastrointestinal.

A continuació es descriuen de forma breu els efectes adversos més destacats dels fàrmacs antiretrovirals agrupats per famílies.

INTI: La toxicitat mitocondrial sol aparèixer a mitjà-llarg termini, i es pot manifestar en forma d'hiperlactatèmia/acidosis làctica, hepatotoxicitat, neuropatia perifèrica, miopatia, cardiomiopatia, pancreatitis i lipoatròfia. La toxicitat mitocondrial és conseqüència de la inhibició de la ADN-polimerasa mitocondrial γ de les cèl·lules humanes per part dels INTI, sobretot el d4T, l'AZT i la ddi (25).

La reacció d'hipersensibilitat a ABC es presenta entre el 5-8% dels pacients, sol aparèixer durant les primeres 6 setmanes de tractament i pot ser molt greu, inclús fatal. La clínica consisteix en la presència de més d'un dels següents símptomes o signes: febre, miàlgies, símptomes respiratoris, gastrointestinals i exantema. El tractament és la suspensió del fàrmac. Existeix un marcador específic, el HLA-B*5701 que té un alt valor predictiu negatiu. Està indicat realitzar el test HLA-B*5701 abans d'iniciar un tractament que contingui ABC. Si el test és positiu està contraindicat el seu ús (26).

La nefrotoxicitat associada a TDF té una incidència baixa. Es tracta d'una disfunció tubular renal per acumulació intracel·lular del fàrmac i es manifesta amb diferents tipus d'anomalies tubulars (síndrome de Fanconi, secreció inadequada de ADH), acompanyat d'una reducció del filtrat glomerular. La retirada del TDF sol resoldre el quadre (27).

INNTI: L'exantema sol ser una erupció cutània maculopapular lleu, però pot arribar a evolucionar a formes greus com el síndrome de Stevens-Johnson. L'hepatitis pot aparèixer a curt plaç, en les primeres setmanes de tractament, i obeiria a un mecanisme immunològic o be més a llarg plaç i dependria d'un efecte tòxic directe del fàrmac (28). Els símptomes neuropsiquiàtrics associats a efavirenz, afecten al voltant del 50% dels pacients i apareixen a l'inici del tractament, siguent en la majoria dels pacients autolimitats (29).

IP: De forma aguda poden provocar intolerància gastrointestinal en forma de diarrees, nausees, vòmits, disconfort abdominal. A mitjà-llarg termini s'associen a alteracions del metabolisme lipídic (hipertrigliceridèmia, hipercolesterolèmia i disminució de lipoproteïnes d'alta densitat (HDL)), resistència a la insulina (RI) i lipodistròfia (LD). Les característiques d'aquesta toxicitat a mitjà-llarg termini, motiu de la present tesi, s'expliquen en el següent apartat.

4. LIPODISTRÒFIA ASSOCIADA AL VIH

Les primeres publicacions de LD associada al TARGA són de 1998 (30,31) i coincideixen en el temps amb la introducció dels IP, pel que inicialment es va pensar que aquests fàrmacs n'eren els causants. Posteriorment es va veure, però, que també es podia observar en pacients que mai havien pres IP (32). Tot i que s'ha investigat molt, la seva etiopatogènia no està plenament aclarida, i es pensa que és multifactorial. Així doncs, els fàrmacs antiretrovirals, la inflamació crònica produïda pel VIH, el propi VIH, factors ambientals i probablement una susceptibilitat genètica interactuarien per provocar aquesta síndrome (33).

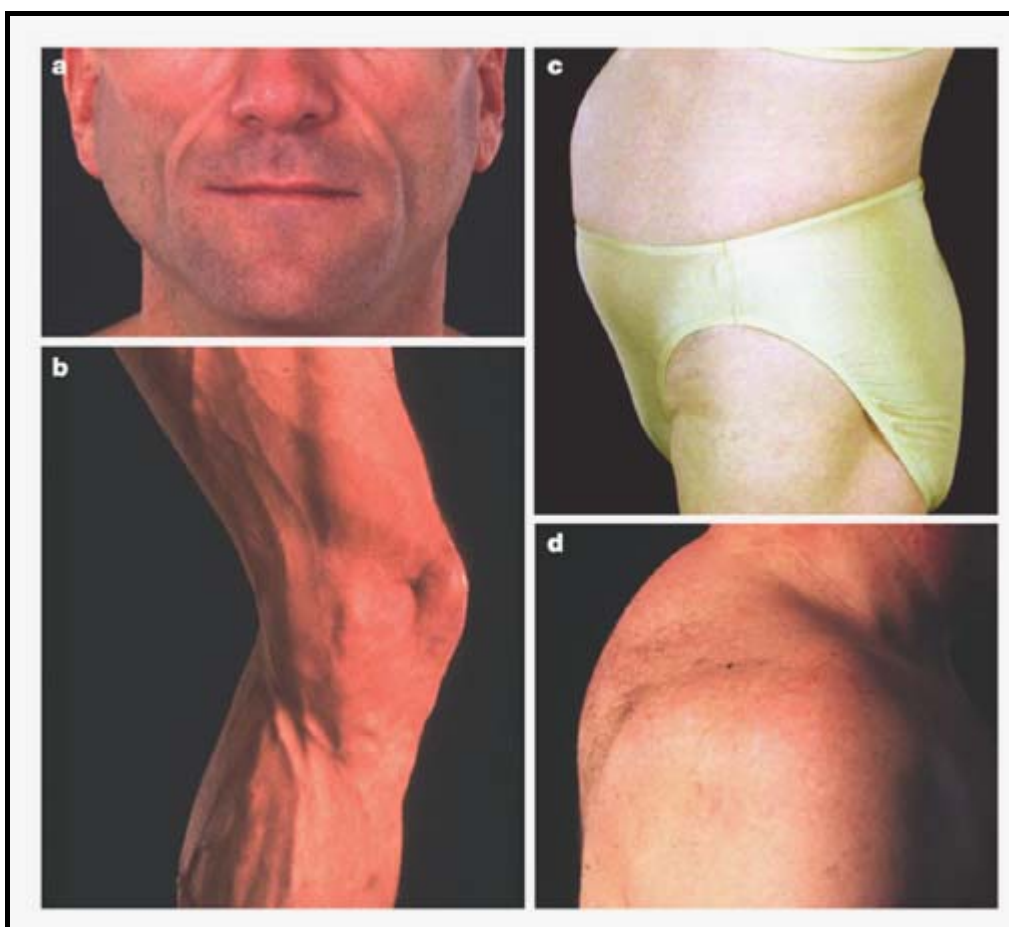
El canvi en l'aspecte físic que provoca la LD pot estigmatitzar el pacient i pot comportar un deteriorament en la qualitat de vida així com comprometre l'adherència al tractament (34), interferint finalment en l'eficàcia del mateix. A més, les alteracions metabòliques que freqüentment s'hi associen constitueixen un factor de risc cardiovascular i, de fet, diversos estudis han demostrat un augment de la incidència de malaltia coronària, aterosclerosi subclínica i alteració endotelial en pacients en tractament amb TARGA (35,36).

4.1 Definició

La LD consisteix en un canvi en la distribució del greix corporal. Es diferencien 2 fenotips que poden aparèixer aïlladament o combinats: la lipoatròfia i la lipohipertròfia (Figura 6). En la lipoatròfia es produeix una disminució del greix subcutani a la cara, les extremitats i/o les natges. La lipohipertròfia consisteix en una acumulació de greix a l'abdomen (visceral i subcutani), la regió dorsocervical, les mames, les aixelles, la zona glútia i/o la zona suprapúbica, així com

lipomes en tronc i extremitats. La LD freqüentment s'associa a alteracions metabòliques com són la hipertrigliceridèmia, hipercolesterolèmia, nivells baixos de HDL i RI amb o sense diabetis mellitus (DM) (37).

Figura 6. Lipoatròfia fascial (a) i en extremitat inferior (b). Lipohipertròfia abdominal (c) i en regió dorsocervical o jiva de búfal (d). (Imatge extreta de Nature Review Drug Discovery 2002;2:624-634)



4.2. Prevalença i factors de risc

Els diferents estudis epidemiològics sobre la prevalença de LD ofereixen dades molt variables i divergents, i oscil·la entre el 18-83% dels pacients que reben TARGA (37,38). Aquest fet es deu, en part, a que no existeixen uns criteris diagnòstics definits. Amb els nous fàrmacs antiretrovirals, menys tòxics, s'ha demostrat una disminució del risc de LD (39,40).

Els factors de risc que en diferents estudis s'han relacionat amb la presència de LD són: la duració del tractament antirretroviral (major durada s'associa a major risc), el tipus de tractament antiretroviral (estavudina s'ha associat en múltiples estudis a lipoatròfia), l'edat avançada, un menor índex de massa corporal a l'inici del TARGA, el gènere (sexe femení, major risc de LD), un major increment de CD4, un descens de càrrega viral plasmàtica deguda al TARGA més acusada i l'existència de coinfecció pel virus hepatitis C (VHC) (38,41,42).

Les alteracions del metabolisme lipídic en pacients en tractament amb IP oscil·len entre el 28-80%, i les més freqüents són la hipertrigliceridèmia (40-80%) i la hipercolesterolèmia (10-50%). La majoria de IP excepte atazanavir i probablement darunavir s'associen a elevació del colesterol total (CT), triglicèrids (TG) i lipoproteïnes de baixa densitat (LDL). Els INNTI tenen un millor perfil lipídic al provocar un augment de HDL, sobretot la nevirapina. Entre els INTI, el d4T i l'AZT s'associen a un augment de CT i TG, mentre que TDF té un millor perfil lipídic (43,44).

Respecte les alteracions del metabolisme de la glucosa, la DM té una prevalença del 2-5% segons les sèries, mentre que la RI es descriu en aproximadament el 50 % dels pacients en tractament amb IP vs el 25% dels pacients amb pautes de nucleòsids. Entre els factors de risc s'inclou: obesitat, lipoatròfia, la majoria dels IP, exposició a INTI (particularment el d4T), edat avançada, antecedents familiars de DM i possiblement coinfecció pel VHC (44,45).

4.3. Diagnòstic

Avui dia encara no disposem d'un mètode objectiu validat per diagnosticar la presència i la gravetat de la LD. L'any 2003 es van proposar uns criteris diagnòstics de LD a partir d'un "score" basat en paràmetres antropomètrics, metabòlics i tècniques d'imatge, però el seu ús no s'ha generalitzat en la pràctica clínica habitual, probablement per la complexitat en la seva aplicació (46).

Per tant, no existeix en l'actualitat una definició o tècnica diagnòstica que permeti establir el diagnòstic definitiu de LD. El mètode diagnòstic més àmpliament acceptat és la percepció per part del pacient d'acumulació o pèrdua de greix en una o més zones corporals, confirmada pel metge en l'exploració física. L'avaluació antropomètrica de la circumferència de les cames i dels plecs

subcutanis aporten informació però són limitats per ser operador dependent. El perímetre abdominal és útil en la quantificació del greix visceral, i es considera elevat ≥ 102 en l'home i ≥ 88 cm en la dona. La quantificació de greix objectiva es pot obtenir mitjançant la Dexa (dual-energy X-ray absorptiometry), la TAC i la ressonància magnètica; de totes maneres aquestes tècniques se solen utilitzar només en la recerca i no en la pràctica clínica habitual ja que necessiten d'un equipament, són relativament cares i ademés no han demostrat una clara avantatge sobre l'examen físic (44).

4.4. Etiopatogènia

Tot i que l'etiopatogènia de la LD no està plenament aclarida, es coneixen diversos factors que intervenen en la seva aparició. Entre ells, el TARGA hi té un paper transcendent. Els IP i els INTI, sobretot els anàlegs timidínics, són els antiretrovirals més freqüentment associats a LD (38,44), tot i que els INNTI també s'hi han associat (47). La inflamació crònica fruit de la infecció pel VIH, proteïnes del propi VIH i factors de vulnerabilitat individual, també estan implicats en la seva aparició (33). Els canvis morfològics que es produeixen en la LD reflecteixen canvis cel·lulars i moleculars que tenen lloc en el teixit adipós. És necessari, per tant, fer esment a l'estructura i fisiologia del teixit adipós per a poder entendre els mecanismes que condueixen al desenvolupament de la LD.

4.4.1. El teixit adipós

El teixit adipós és l'òrgan diana de la LD. El teixit adipós està format per adipòcits, i una fracció vascular-estromal que conté macròfags, fibroblastes, cèl·lules endotelials i preadipòcits. El teixit adipós, a part de ser un teixit d'emmagatzematge de lípids, sintetitza una important quantitat de proteïnes (Taula 4) que actuen com a mediadors del metabolisme lipídic i glicèmic i de la inflamació. (48,49,50).

Taula 4. Principals proteïnes secretades pel teixit adipós.

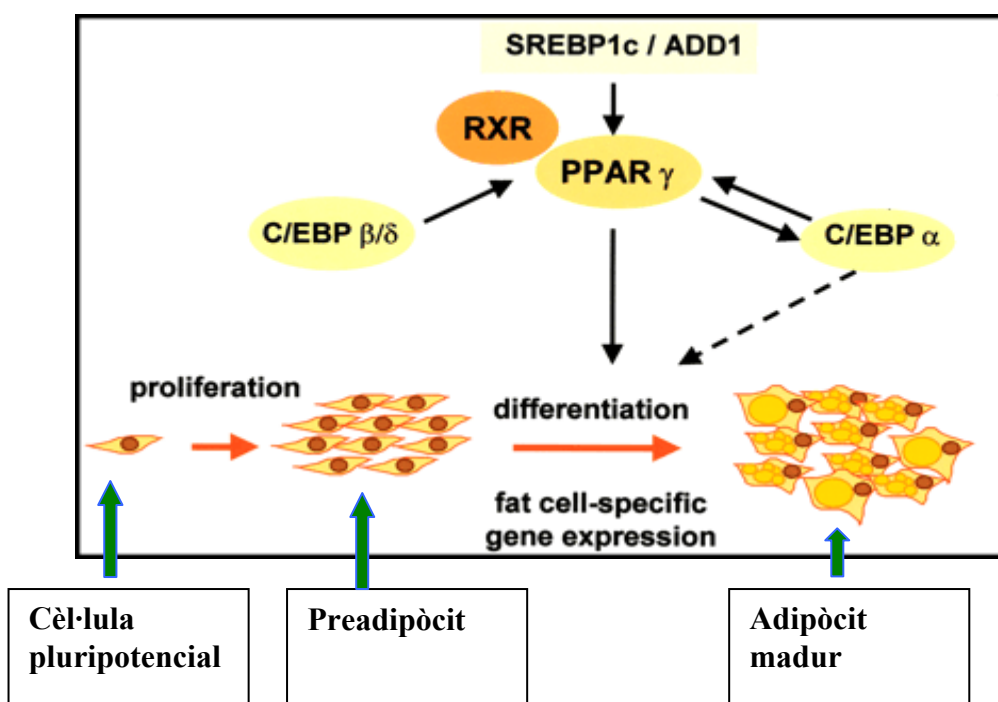
Molècula	Funció/efecte
Leptina	Indica la massa total de greix. Regula la ingesta de greix i la despesa energètica. Relaciona subinflamació crònica i obesitat. Millora SI.
Adiponectina	Sensibilitzador de la insulina. Efecte protector vascular de l'aterogenesis. Propietats antiinflamatòries.
Resistina	RI; inhibeix la diferenciació de l'adipòcit; dany directe sobre l'endoteli. Troballes contradictòries en humans.
Visfastina	Secretada pel teixit adipós visceral; correlació amb massa de greix; provoca una disminució dels nivells de glucosa i insulina; mediador inflamatori
Hepcidina	Els seus nivells augmenten en l'obesitat i es correlaciona amb nivells de proteïna C reactiva i IL-6
Apelina	Els seus nivells augmenten en l'obesitat, pot regular la RI
Vaspina	Secretada pel teixit adipós visceral; millora la SI
Omentina	Secretada pel teixit adipós visceral; expressió disminuïda en obesitat; s'associa a SI
Adipsina	Component de la via alternativa del complement. Possible unió entre l'activació d'aquesta via i el metabolisme del teixit adipós
Proteïna estimuladora de l'acetilació (ASP)	Estimula la síntesi de triacilglicerol en teixit adipós
Adipofilina	Marcador específic de l'acumulació de lípids en les cèl·lules
Proteïna unida a retinol -4 (RBP-4)	S'associa a RI
Proteïna d'adipòcits unida a àcid gras (A-FABP 4)	Proteïna transportadora d'àcids grassos en l'adipòcit
Sèrum amiloide A (SAA)	Correlació amb RI; s'associa a inflamació sistèmica i aterosclerosi
Factor de necrosis tumoral - α (TNF- α)	Citoquina proinflamatòria. Indueix apoptosi i RI
Interleuquina-6 (IL-6)	Relacionada amb el metabolisme de la glucosa i els lípids. Indueix RI.
Inhibidor de l'activador del plasminogen tipus 1 (PAI-1)	Inhibidor de la fibrinolisi. Nivells elevats en individus obesos. Factor de risc cardiovascular
Factor tisular	Iniciador de la cascada de la coagulació
Angiotensinogen	Precursor de l'angiotensina II. Regulació de la tensió arterial
Molècula d'adhesió intercel·lular (ICAM-1)	Molècula d'adhesió intercel·lular. Unió de leucòcits a l'endoteli. Proinflamatòria.
Proteïna quimioatracció de macròfags (MCP-1)	Migració de monòcits al teixit adipós i diferenciació a macròfags
Factor inhibidor de macròfag (MIF)	Relacionat amb processos inflamatoris i immunoregulació
Prostaglandines 2 i $F_{2\alpha}$	Relacionat amb inflamació, ovulació, menstruació.
Factor de creixement- β transformador (TGF β)	Regula una àmplia varietat de respostes biològiques com la proliferació, diferenciació, apoptosi i desenvolupament de múltiples tipus cel·lulars. Augment de l'expressió en obesitat. Augmenta proliferació de preadipòcits. Augmenta síntesi PAI-1
Factor de creixement-I insulin like (IGF-I)	Estimula la proliferació en molts tipus cel·lulars i media alguns dels efectes de l'hormona de creixement
Esteroides sexuals (testosterona i estradiol)	Òrgans reproductors, sexualitat

RI: resistència a la insulina; SI: sensibilitat a la insulina

L'adipogènesi consisteix en la formació d'adipòcits a partir d'un precursor mesenquimàtic pluripotencial. Aquest es diferencia en adipoblast, després en preadipòcit i finalment en adipòcit madur. Durant aquest procés es produeix una activació seqüencial de factors de transcripció que regulen l'expressió de gens i proteïnes específiques de l'adipòcit que permeten l'adquisició del fenotip adipocitari (51) (Figura 7). Els principals factors de transcripció adipocitaris són:

- CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP) α i β
- Sterol-regulatory-element-binding-protein-1 (SREBP-1)
- Peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR γ)

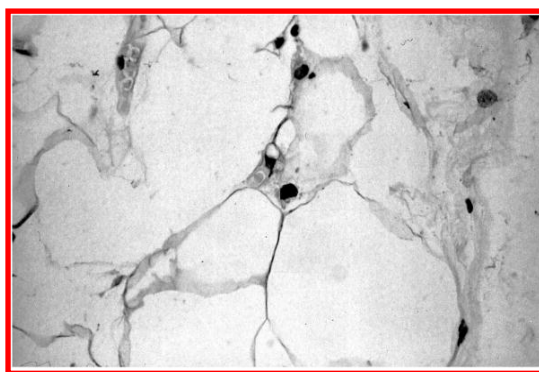
Figura 7. Adipogènesi (Imatge extreta de la referència 51).



El teixit adipós de pacients amb LD presenta importants canvis morfològics: increment d'apoptosi adipocitària, alteració del tamany adipocitari, formació de lipogranulomes focals, augment del número de macròfags i proliferació vascular (52,53) (Figura 8). Aquests canvis s'han correlacionat

amb una alteració en l'expressió d'adipocitoquines i de marcadors de la diferenciació adipocitària, així com amb RI (53).

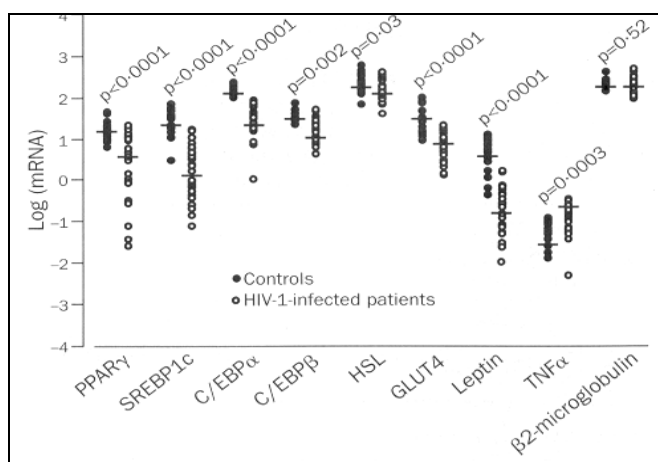
Figura 8. Teixit adipós de pacients amb LD que presenta cèl·lules adipocitàries apoptòtiques per la tècnica de TUNEL. (Extret de de referència 52)



4.4.2. Alteració de la diferenciació adipocitària

Estudis *in vitro* en línies cel·lulars adipocitàries han mostrat que alguns IP (NFV, RTV, LPV) i INTI (AZT i d4T) alteren la diferenciació adipocitària mitjançant una inhibició en l'expressió dels factors de transcripció adipogènics SREBP-1, C/EBP α i PPAR γ , associat a una disminució en l'expressió d'enzims relacionats amb el metabolisme lipídic i glucèmic i l'acumulació de TG a l'interior de l'adipòcit (54-57). L'EFV també ha demostrat capacitat per inhibir l'expressió de SREBP-1 (58). L'alteració de la diferenciació adipocitària provocaria una disminució de la producció i de la viabilitat dels adipòcits, causant finalment una pèrdua i disfunció del teixit adipós. Estudis *ex vivo* concorden amb les troballes *in vitro* i s'ha demostrat, doncs, que el teixit adipós de pacients amb LD presenta alteracions en l'adipogènesi, amb disminució de l'expressió dels factors de transcripció adipogènics PPAR γ , SREBP-1 i C/EBP α , a més d'una alteració en l'expressió de marcadors adipocitaris de sensibilitat a la insulina com el transportador de glucosa 4 (GLUT4) i del metabolisme lipídic com la lipasa hormona sensible, la lipoprotein lipasa (LPL) i l'acil coenzim A sintasa (53,59,60) (Figura 9).

Figura 9. Concentració de RNAm de factors de transcripció i marcadors adipocitaris de teixit adipòs de pacients VIH amb lipoatròfia i controls sans (extret de referència 59).



HSL: lipasa hormona sensible; GLUT4: transportador de glucosa 4

La lamina és una proteïna nuclear que forma una xarxa filamentosa sota la membrana nuclear interna i participa en la integritat estructural del nucli i en el control de l'expressió gènica. S'han descrit 2 isoformes, la lamina tipus A i la C. La lamina A interacciona amb el factor de transcripció SREBP-1. El nostre grup ha descrit uns nivells de RNAm de lamina A en teixit adipòs subcutani inferiors en pacients amb infecció pel VIH que en controls sans, sense diferències entre pacients amb/sense LD. L'expressió de lamina A es va correlacionar positivament amb el PPAR γ mentre que l'ARNm d'IL-6 va ser un factor independent negatiu de l'expressió de lamina A (61).

4.4.3. Adipocitoquines

Les adipocitoquines son proteïnes solubles sintetitzades en el teixit adipòs, tan per l'adipòcit com per altres cèl·lules que hi són presents, com els macròfags. Les adipocitoquines faciliten la comunicació intercel·lular i transmeten informació a cèl·lules diana a través d'una interacció receptor-lligand. A la Taula 5 s'exposen les principals adipocitoquines que s'han estudiat en la LD associada al TARGA.

Taula 5. Adipocitoquines implicades en la patogènia de la LD associada al TARGA.

Adipocitoquina	Efectes metabòlics	Estudis <i>in vitro</i> en línies cel·lulars adipocitàries	Estudis <i>in vivo</i> en pacients VIH amb LD
TNF- α	Insulinresistència, inhibeix l'expressió dels factors de transcripció adipogènics, indueix apoptosi adipocitària, augmenta la lipòlisis. Inhibeix adiponectina i estimula leptina Disfunció cadena respiratòria mitocondrial. Augmenta síntesis de ROS	IP i INTI timidínics augmenten l'expressió gènica i secreció proteica (62,63)	Augment ARNm en TA Augment de nivells plasmàtics de TNFR1 i 2 Correlació positiva amb apoptosi en el teixit adipós i RI (veure text)
IL-6	Citoquina proinflamatòria. S'associa a RI	IP i INTI timidínics augmenten l'expressió gènica i secreció proteica (62,63)	Augment ARNm en teixit adipós. Nivells plasmàtics sense canvis. Correlació negativa SI (veure text)
Adiponectina	Augmenta la SI, estimula l'oxidació dels AG. Propietats antiinflamatòries	IP i INTI timidínics disminueixen l'expressió gènica i secreció proteica (62,63)	ARNm en teixit adipós disminuïda. Nivells plasmàtics disminuïts en la lipoatròfia (veure text)
Leptina	Regula el pes corporal, ajustant el balanç entre la ingesta i el gasto d'energia. Citoquina sensibilitzadora de la insulina.		Lipoatròfia: nivells plasmàtics de leptina més baixos; lipohipertròfia: nivells més elevats Disminució ARNm en TA de pacients amb LD (64)
Resistina	RI. Funcions controvertides		No s'ha trobat relació amb LD o RI (65)
IL-18	Citoquina proinflamatòria. Associació amb RI		Nivells en sang elevats en pacients amb LD. Augment ARNm en greix abdominal de pacients amb LD. Correlació positiva entre ARNm d'IL-18 i ARNm de TNF- α i IL-6 en greix (66)
IL-8	Patogènesis aterosclerosi. Augmenta en obesitat.		ARNm en greix abdominal augmentada en LD (67). Correlació ARNm en TA negativa amb adiponectinèmia i positiva amb nivells plasmàtics TNF- α i ARNm en TA d'IL-6. (68)
Interferó- α	Citoquina inflamatòria. Regula metabolisme lipídic: augment lipogenesis hepàtica i la lipolisis i disminueix activitat LPL i aclarament de TG		Concentració augmentada en pacients amb LD. Correlació positiva entre concentració d'interferó- α i colesterol, LDL, VLDL, ApoB i ApoB:ApoA1 (69)
IL-1 β	Citoquina proinflamatòria. Alteració metabolisme lipídic adipocitari, diferenciació i supervivència adipocitària	IP i INTI timidínics: augment secreció i expressió en TA	
Lipina	Proteïna relacionada amb el metabolisme lipídic i glicèmic. Afavoreix síntesis de TG i actua com a coactivador transcripcional de gens relacionats amb metabolisme lipídic		ARNm en TA es correlaciona amb massa de greix en cames. ARNm més baix en pacients amb LD (70)

AG: àcid gras; ARNm: àcid ribonucleic missatger; IL: interleuquina; INTI: inhibidor no nucleòsid de la transcriptassa inversa; IP: inhibidor de la proteassa; LA: lipoatròfia; LDL: lipoproteïna de baixa densitat; LPL: lipoprotein lipasa; RI: resistència a la insulina; ROS: radicals lliures d'oxigen; SI: sensibilitat a la

insulina; TA: teixit adipós; TNFR: Receptor de factor de necrosis tumoral ; VLDL : lipoproteïna de molt baixa densitat.

Estudis *in vitro*

Estudis *in vitro* en línies cel·lulars adipocitàries han mostrat que alguns IP (NFV, RTV i LPV) i INTI (d4T i AZT) incrementen l'expressió i secreció de IL-6, IL-1 β i TNF- α mentre que disminueixen l'expressió d'adiponectina. Aquestes alteracions s'associen a apoptosi, disfunció dels adipòcits (disminució en l'acumulació de lípids i en l'expressió d'enzims del metabolisme lipídic) i resistència a la insulina (62,63)

Estudis *ex vivo*

En mostres de teixit adipós de pacients amb lipoatròfia s'ha demostrat un augment en l'expressió d'ARNm de les citoquines proinflamatòries TNF- α i IL-6 (53,59,60,62). Existeix una correlació positiva entre l'expressió d'IL-6 i TNF- α i l'apoptosi adipocitària i la RI; mentre que la correlació és negativa amb el factor de transcripció C/EBP α . També s'ha objectivat en pacients amb lipoatròfia una disminució de l'expressió gènica de leptina i adiponectina i aquesta s'ha correlacionat positivament amb marcadors d'expressió adipogènics i sensibilitat a la insulina (53).

El nostre grup va demostrar que existeix un augment significatiu dels nivells plasmàtics dels receptors solubles de TNF- α (TNFR1 i TNFR2) en pacients infectats pel VIH amb LD associada al tractament antiretroviral comparats amb pacients tractats sense LD i, sobretot, amb controls no infectats. En aquest estudi, també es va evidenciar que hi havia una correlació positiva entre TNFR1 i 2 amb el grau d'apoptosi en teixit adipós i aquesta associació fou observada també en un subestudi *in vitro* realitzat amb preadipòcits 3T3 diferenciats i va resultar independent dels fàrmacs antiretrovirals que es posaven en el medi de cultiu adipocitari (71). Dades addicionals d'aquest treball, indicaren que els pacients amb LD tenien uns nivells plasmàtics d'IL-6 més elevats i de leptina més baixos en relació als controls sans (71). Altres estudis també han documentat uns nivells plasmàtics més elevats de TNFR-1 i 2 i IL-6 en pacients amb LD, fet que s'ha associat a un augment de la secreció de TNF- α pel teixit adipós (72). La disregulació del sistema TNF- α també s'ha associat a un augment de l'activitat del PAI-1, detectada en pacients amb LD (67).

El TNF- α té un paper cabdal en la fisiopatologia de la LD, tal i com ho confirmen els estudis prèviament mencionats. Hi ha un increment de la seva producció que sembla clarament deguda al tractament antirretroviral i al propi VIH i modulada també per la presència de LD. Es creu que aquesta síntesis incrementada podria tenir lloc en teixit adipós, a partir dels adipòcits i/o macròfags, i en els limfòcits T circulants, tal i com suggereix l'acumulació de limfòcits T circulants amb síntesis de TNF- α en pacients amb LD (73). Addicionalment, l'increment de TNF- α pot estar implicat en l'alteració de la diferenciació adipocitària, en l'apoptosi adipocitària i en la resistència a la insulina pròpies dels pacients amb LD.

L'adiponectina, una adipocitoquina relacionada amb sensibilitat a la insulina, presenta una disminució de la seva expressió en teixit adipós de pacients amb LD (53,68). També s'ha demostrat una disminució en la seva concentració plasmàtica en pacients amb LD, que es correlaciona inversament amb la concentració de triglicèrids i la RI (74). El TNF- α té un efecte inhibitori sobre l'adiponectina (62).

En pacients amb lipoatròfia s'han detectat nivells en plasma de leptina disminuïts en comparació amb els pacients amb lipohipertròfia, que els tenen augmentats. S'ha demostrat una correlació positiva entre els nivells de leptina en plasma i la massa de teixit adipós, així com associació entre hipoleptinèmia i RI (64).

Hi ha altres adipocitoquines que s'han relacionat amb la LD. El seu efecte no està tan estudiat com en les que acabem de comentar. Les evidències més destacables es resumeixen a la Taula 5.

4.4.4. Toxicitat mitocondrial

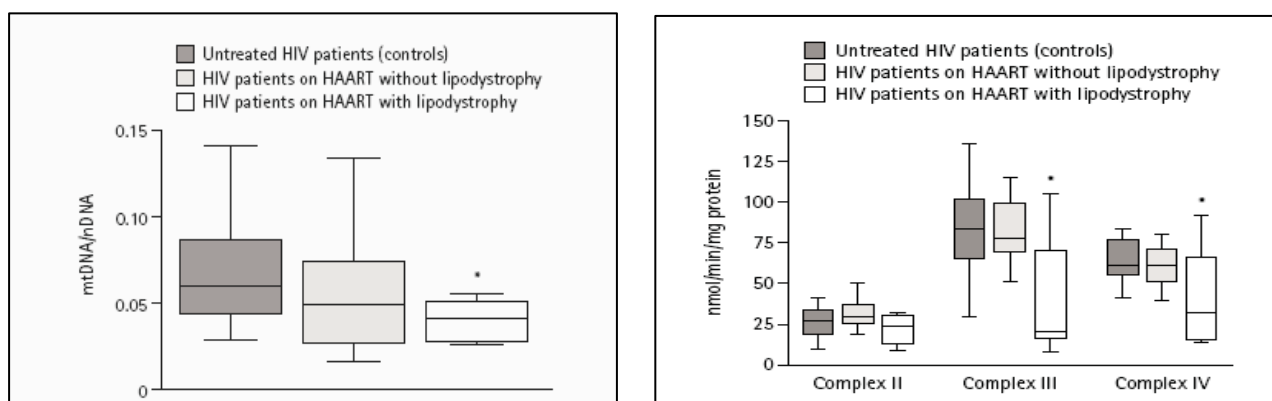
Els INTI, tenen capacitat d'inhibir l'ADN polimerasa- γ mitocondrial. Aquest enzim és el responsable de la replicació del ADN mitocondrial (ADNmt). Aquesta inhibició causa un disfunció a la cadena respiratòria mitocondrial, per disminució de la síntesi de les proteïnes que en són responsables. Aquest fet pot provocar un augment de radicals lliures d'oxigen, els quals són mediadors de la lliberació de TNF- α , i de l'apoptosi, així com disminució de la síntesi energètica (75). En pacients que reben tractament amb INTI i presenten LD s'ha observat una alteració de la

morfologia mitocondrial, un augment del contingut mitocondrial i una disminució del ADNmt en teixit adipós (75,76), així com en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica associat a una disminució de l'activitat dels enzims mitocondrials (77) (Figura 10). En un estudi prospectiu en pacients que inicien INTI s'observà també, a més d'una disminució de l'ADNmt, una alteració de la funcionalitat dels enzims de la cadena respiratòria en teixit adipós (78). Recentment, s'ha demostrat un augment de l'estrès oxidatiu i l'apoptosi d'adipòcits vehiculitzada per via mitocondrial en biòpsies de greix de pacients amb LA (79).

Un estudi *in vitro* ha demostrat que els IP i els INTI provoquen un augment d'estrès oxidatiu degut a disfunció mitocondrial i que aquest fet s'associa a una disminució del contingut de lípids en l'adipòcit, un augment de la síntesi d'espècies d'oxigen reactives (ROS), així com un augment de la síntesis de MCP-1 i de IL-6 (80).

El propi VIH també ha mostrat uns efectes nocius sobre el mitocondri; així, en pacients naïve, s'ha detectat deplecció de l'ADNmt i disfunció de la cadena respiratòria en limfòcits de sang perifèrica (81).

Figura 10. Contingut d'ADNmt i activitat d'enzims de la cadena respiratòria en pacients sense infecció pel VIH i pacients amb TARGA amb i sense LD (extret de referència 77).



4.4.5. Efectes directes del TARGA

Els IP inhibeixen l'activitat de GLUT4 i la funció del receptor LDL (LRP). Estudis *in vitro* amb adipòcits humans han evidenciat que l'addició de ritonavir és capaç de suprimir l'expressió de GLUT4 i d'inhibir la lipogènesi induïda per insulina, fet que provoca RI (82).

4.4.6. Factors del propi VIH

Recentment, s'ha demostrat que el propi VIH provoca alteracions en l'expressió gènica de diferents proteïnes i factors de transcripció en teixit adipòs. Així, en un estudi que comparava pacients infectats pel VIH naives i individus no infectats, en el teixit adipòs dels infectats pel VIH es va observar que hi havia una reducció significativa en l'expressió de gens relacionats amb la funcionalitat mitocondrial (COII, UCP-2 [mitocondrial uncoupling protein-2]) i amb el metabolisme lipídic i dels hidrocarbonats, com PPAR γ , GLUT4 i lipoproteinlipasa. Els individus VIH no tractats també presentaven una alteració en l'expressió d'adipocitoquines, concretament un augment de TNF- α i una disminució de leptina i adiponectina. (83). L'efecte del propi VIH sobre la supressió de l'expressió de PPAR- γ ha estat confirmat en estudis *in vitro* amb adipòcits tractats amb les proteïnes virals Nef i Vpr (84,85).

4.4.7. Inflamació crònica

El teixit adipòs de pacients amb LD presenta senyals d'inflamació crònica, com la presència de lipogranulomes focals i infiltració per macròfags (51,52). S'ha avaluat l'efecte dels fàrmacs antiretrovirals sobre una línia cel·lular de macròfags humans i es demostrà que alguns IP provoquen un augment de la MCP-1 i de la MIP-1 α , així com citoquines proinflamatòries com TNF- α i IL-1 β (86). Aquests fenòmens relacionarien la LD amb una inflamació crònica del teixit adipòs.

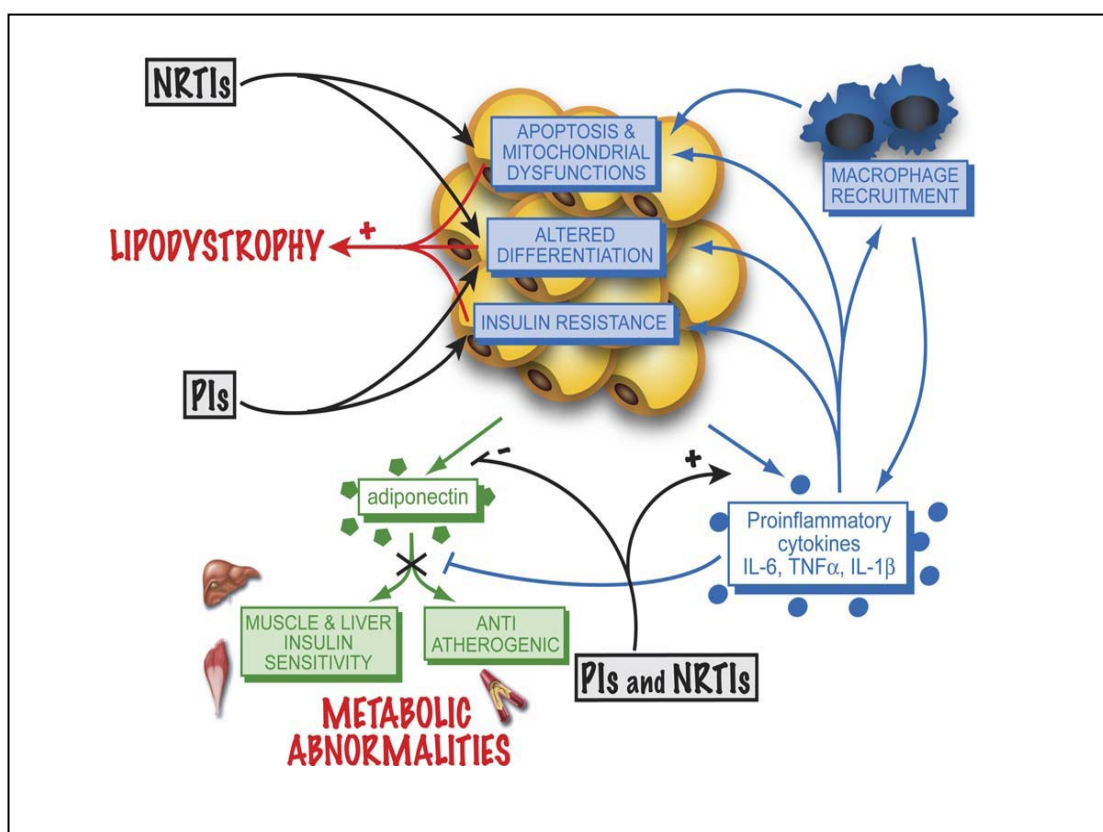
4.4.8. Visió global

Els INTI i els IP, actuant probablement de forma sinèrgica, produeixen per un costat una inhibició dels factors de transcripció adipocitaris que causa una inhibició de la diferenciació adipocitària i de la síntesi de la seva maquinària enzimàtica. Per un altre costat, provoquen un augment de citoquines proinflamatòries (TNF- α i IL-6 entre d'altres) i una disminució d'adiponectina i de leptina. El trastorn mitocondrial atribuït als INTI també contribuiria a l'apoptosi adipocitària i a un augment addicional de citoquines proinflamatòries. Tots aquests fenòmens s'associen a dediferenciació, disfunció i apoptosi adipocitària accelerada, amb disminució del número i del

tamany dels adipòcits. Tot això contribueix al fenotip de la lipoatròfia (Figura 11). Tant la disfunció adipocitària com l'alteració en la síntesi d'adipocitoquines provoquen RI. La disfunció dels adipòcits del teixit adipós perifèric impedeix l'emmagatzematge de lípids, fet que causaria un augment plasmàtic d'àcids grassos lliures que s'acumularien a teixit adipós visceral produïnt a lipohipertròfia visceral, així com en fetge i múscul, intensificant la RI (55,86).

Hi ha diferents mecanismes relacionats amb l'aparició de RI com són: l'activació de $\text{TNF-}\alpha$ i de IL-6 que alteren la senyal de la insulina, l'elevació dels nivells d'àcids grassos lliures plasmàtics per l'efecte lipolític del $\text{TNF-}\alpha$ i la IL-6 que produeix RI en el fetge i múscul, la disminució en la síntesi d'adiponectina, la inhibició per part d'alguns IP del transport de glucosa mediat per GLUT4 i la disminució del catabolisme de la insulina (45).

Figura 11. Visió global hipotètica esquematitzada de l'etiopatogènia de la LD en pacients amb infecció pel VIH i TARGA (extreta de referència 55).



5. FARMACOGENÈTICA DE LA LIPODISTRÒFIA I LES ALTERACIONS METABÒLIQUES ASSOCIADES AL TARGA

Existeix una gran variabilitat interindividual en l'aparició d'efectes adversos relacionats amb el TARGA. El fet que no tots els pacients que prenen un mateix TARGA i tenen unes característiques demogràfiques, virològiques i immunològiques similars, desenvolupin els mateixos efectes adversos fa pensar en una susceptibilitat individual, en la que els determinants genètics de l'hoste hi podrien tenir un paper destacat. La farmacogenètica és la ciència que estudia les variacions interindividuals en la resposta i la toxicitat degudes a fàrmacs determinades per variacions en la composició genètica de les persones. Atès que és una ciència relativament nova i que té una nomenclatura particular, hem reflectit a la Taula 6 un recull dels conceptes generals de farmacogenètica. El polimorfisme de nucleòtid simple (PNS) és el tipus de variació genètica més comú (87).

Els estudis de farmacogenètica es poden agrupar en 3 grans grups:

- Estudis de gens candidats: es basen en l'estudi de polimorfismes genètics de gens que es coneix que tenen un paper en la fisiopatologia o bé que s'ha demostrat prèviament que tenen alguna influència en el trastorn a estudiar. (87).
- Estudis multigen: estudis en que s'analitzen diversos gens amb un reconegut paper en la fisiopatologia del trastorn a estudiar de forma conjunta. Augmenten la precisió i validesa dels test de predicció genètics respecte els estudis d'un sol gen (88,89).
- 'Genome Wide o Whole Genome Association Studies' (GWAS): es basen en l'estudi de variacions genètiques en tot el genoma humà amb l'objectiu d'identificar associacions genètiques amb trets observables (fenotip). Pretén descobrir nous gens candidats o regions genòmiques candidates generant noves hipòtesis que cal que siguin confirmades en estudis de replicació i la plausibilitat biològica dels quals ha de ser investigada (87). Aquests estudis han permès la identificació de nous gens i conseqüentment noves proteïnes o mecanismes relacionats amb el desenvolupament de diverses malalties complexes com la malaltia de Crohn, la diabetes mellitus, la dislipèmia o la malaltia coronària (90); en el

camp del VIH han permès la identificació de polimorfismes genètics que influencien la càrrega viral dels pacients infectats per VIH durant la fase asimptomàtica (91).

Taula 6. Conceptes i nomenclatura en farmacogenètica

- **Al·lel:** és cada una de les formes possibles d'un gen determinat. Els éssers humans posseeixen 2 còpies de cada gen, és a dir 2 al·lells. Al·lel comú: és l'al·lel que posseeix la seqüència de referència i el que es troba amb major freqüència en la població general. Al·lel rar: és l'al·lel que difereix de la seqüència de referència.
- **Codó:** seqüència de 3 bases del ADN o ARN que dona lloc a un aminoàcid.
- **Exó:** regió del gen que codifica per una proteïna
- **Intró:** regió del gen que no codifica per una proteïna.
- **Freqüència al·lèlica:** és una mesura de la freqüència relativa d'un al·lel en una població determinada.
- **Fenotip:** és la manifestació clínica o expressió del genotip. Es refereix a qualsevol característica detectable en un individu determinat, entre altres factors pel seu genotip.
- **Genotip:** és el conjunt d'al·lells que posseeix un individu concret i que determinaran el fenotip
- **Haplotip:** conjunt de PNS que és troben pròxims i s'hereden sempre de forma conjunta.
- **Homocigot:** presència de 2 al·lells idèntics en el locus específic d'un gen.
- **Heterocigot:** presència de 2 al·lells diferents en el locus específic d'un gen
- **Desequilibri de lligament:** terme que indica una associació de PNS que no és a l'atzar sinó predeterminada en el mateix cromosoma
- **Polimorfisme genètic:** variant al·lèlica que existeix de forma estable en la població. Per ser considerat un polimorfisme cal que la seva freqüència en la població sigui d'almenys un 1%.
- **Polimorfisme de nucleòtid simple (PNS o SNP):** variació d'un sol nucleòtid (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) en la seqüència d'ADN entre membres d'una mateixa espècie. La freqüència de l'al·lel ha de ser > 1% en una població determinada per ser considerat PNS.
Classificació: -PNS no sinònim quan canvia l'aminoàcid que formarà la proteïna; PNS sinònim quan no canvia l'aminoàcid dintre d'una proteïna.
-PNS funcional quan s'altera l'expressió del gen o la funció de la proteïna. PNS no funcional quan no té cap efecte sobre la funció de la proteïna
- **Promotor:** part de la molècula d'ADN que té la informació per fer que el gen s'activi o inactivi.
- **Transició:** mutació consistent en el canvi d'una base púrica (A i G) per una altra púrica o una pirimidica (C o T) per una altra pirimidica.
- **Transversió:** mutació consistent en el canvi d'una base púrica per una pirimidica o una pirimidica per una púrica.

La Taula 7 resumeix les principals proteïnes i els polimorfismes identificats i estudiats fins l'actualitat relacionats amb efectes adversos metabòlics i la LD associats al TARGA, basant-se en estudis de gens candidats i multigen. Respecte la LD s'han descrit un nombre reduït de PNS relacionats amb la seva aparició en pacients VIH sota TARGA, com són el *TNF- α* (92,93), l'*APOC3* (94), el *receptor adrenèrgic β 2*(95) i β 3 (96), la *IL 1 β* (97) i la *polimerasa gamma* (98) tot i que en molts d'ells aquesta relació no s'ha reproduït en altres estudis o bé només s'ha avaluat en un únic estudi. En relació a la dislipèmia, diversos PNS en gens implicats en el transport i aclariment de lipoproteïnes, com són variants al·lèliques del gen *APOE* i *APOC3*, s'han relacionat amb la seva aparició o empitjorament en els curs del tractament amb TARGA (94). En aquest sentit un estudi multigen, realitzat per Arnedo *et al*, en el que s'estudiaren 20 PNS de 13 gens relacionats amb el metabolisme i transport lipídic, va demostrar que PNS en els gens de *ABCA1*, *APOA5*, *APOC3*, *APOE* i *CETP* contribuïen a la hipertrigliceridèmia, PNS en els gens *APOA5* i *CETP* contribuïen a concentracions baixes de HDL i finalment PNS en els gens *CEPT* i *LIPG* modulaven els nivells de no-HDL colesterol, en pacients amb TARGA. En aquest estudi, a més, es va crear un score genotípic que relacionava la interacció entre l'efecte acumulatiu de diversos gens i el TARGA sobre la concentració plasmàtics de lípids en els pacients. Alguns d'aquests PNS s'han reproduït en altres estudis, reforçant la idea de l'existència d'un rerafons genètic que incrementa el risc de dislipèmia en pacients VIH amb TARGA (99). Recentment, s'han publicat altres estudis basats en el GWAS en els quals s'han identificat nous PNS associats a l'aparició de dislipèmia i aterosclerosi carotídia en pacients infectats pel VIH (100,101), així com s'ha reproduït la influència de polimorfismes prèviament identificats en estudis de gens candidats i multigen (99). En els últims anys també s'ha estudiat alteracions genètiques en l'ADNmt. S'ha observat l'aparició de mutacions en l'ADNmt en pacients sota tractament amb INTI (102), així com una forta associació entre l'haplogrup (combinació de diferents mutacions en el DNA mitocondrial) H i risc de lipoatròfia en pacients en tractament amb INTI (103) tot i que no s'ha pogut confirmar en un segon estudi (104).

L'aplicació clínica dels estudis genètics seria poder identificar pacients amb risc o predisposició genètica de desenvolupar alteracions metabòliques en tractament amb TARGA, i evitar en aquests

pacients pautes amb un pitjor perfil metabòlic. Avui en dia, i amb els estudis de que disposem, encara no és possible el seu ús en la pràctica clínica diària. El caràcter poligènic i multifactorial (interacció de múltiples gens i de factors ambientals) d'aquests trastorns, fa que la contribució d'un PNS de forma individual sigui generalment modest. En aquest sentit els estudis de GWAS i els estudis de multigen que analitzen l'efecte de múltiples gens conjuntament poden permetre una millor aproximació a la realitat, així com la identificació de nous gens que poden tenir relació amb la patologia estudiada. Ademés, cal que es demostrï la reproducibilitat de les associacions de PNS amb events metabòlics així com la validació en àmplies cohorts i grups ètnics.

Taula 7. Principals polimorfismes estudiats en relació amb la lipodistròfia i els trastorns metabòlics associats

<i>Proteïna</i>	<i>Funció</i>	<i>Polimorfismes estudiats</i>	<i>Població estudiada</i>	<i>Relació amb LD i/o trastorns metabòlics</i>	<i>Ref.</i>
TNF-α	Veure taula 5	-238 G>A -308 G>A	VIH:61LD i 35 no LD; 239 sans	-238 A al·lel és més freqüent en pacients amb LD	92
			220 VIH amb LD	-238 G/A heterozigot s'associa a un inici més precoç de LD i augment del risc de progressió de LD	93
			Estudi longitudinal de 329 pacients amb TARGA	No associació (-238 G>A)	94
ApoC3	Inhibició de la LPL (modula lipolisis i aclarament hepàtic de TG) (augmenta nivells de TG)	-455 C>T -482 C>T +3238 C>G	Estudi longitudinal de 329 VIH amb TARGA	Hipertrigliceridèmia (empitjora amb TARGA, especialment RTV) i elevació de colesterol no-HDL. Portadors de les 3 variants al·lèliques tenen més risc desenvolupar LD	94
			626 VIH amb TARGA	-482 CT i TT i -455 CC i CT s'associen a disminució de TG en pacients hispànics i en tt amb IP	105
			255 VIH; 71 desenvolupen LD	-455 CC: menor risc de LA	95
			40 VIH amb TARGA	Haplotip -455 C/-482 T: menor massa grassa (DEXA) i increment de TG	106
ApoA5	Inhibició síntesis VLDL i hidròlisis TG (disminueix nivells de TG)	-1131 T>C	Estudi longitudinal de 229 VIH amb TARGA	Al·lel C: major increment de TG, CT i major descens HDL després inici TARGA que inclogui IP	107
ApoE	Transport i aclariment de lipoproteïnes (VLDL)	2060 T>C 2198 C>T	Estudi longitudinal de 329 VIH amb TARGA	Hipertrigliceridèmia (empitjora amb TARGA, especialment RTV). Interacció amb PNS <i>APOC3</i> . Elevació de colesterol no-HDL	94

Taula 7 (continuació). Principals polimorfismes estudiats en relació amb la lipodistròfia i els trastorns metabòlics associats

<i>Proteïna</i>	<i>Funció</i>	<i>Polimorfismes estudiats</i>	<i>Població estudiada</i>	<i>Relació amb LD i/o trastorns metabòlics</i>	<i>Ref.</i>
Multidrug resistance gene 1 (MDR)	Proteïna transportadora de lípids	3435 C>T	59 VIH tractats amb efavirenz	CC: s'associa a major augment HDL durant tractament amb efavirenz	108
Proteïna transferidora d'esters de colesterol (CETP)		279 G>A -629 C>A	Estudi longitudinal de 438 VIH amb TARGA	AA s'associa a disminució de la concentració de TG CA i AA s'associen a increment HDL i AA a augment colesterol no-HDL	89
ABC transporter A1 (ABCA1)		2962 A>G	Estudi longitudinal de 438 VIH amb TARGA	GG s'associa a augment concentració de TG	89
Receptor adrenèrgic β3	Estimula lipòlisis del teixit adipós	Trp64Arg	39 VIH(22 LD) i 200 sans	Arg64 al·lel més freqüent en VIH amb LD	96
Receptor adrenèrgic β2	Estimula lipòlisis del teixit adipós	Codó 16 A>G Codó 27 G>C	255 VIH; 71 desenvolupen LD	Codó16 AA: major risc LH Codó 27 CC: menor risc LH	95
			67 VIH en tt amb IP	No associació alteració lípids	109
PPARγ	Veure text (pag.37)	161C>T	255 VIH; 71 desenvolupen LD	No associació amb LD	95
Resistina	Obesitat/RI	Seqüenciació tot el gen de la resistina	189 VIH amb alteració lipídica i RI amb TARGA	1 polimorfisme de la resistina és més freqüent en pacients amb varies alteracions metabòliques	110
IL-6	Veure taula 5 i text (pag. 35)	-174 G>/C	189 VIH amb alteració lipídica i RI amb TARGA	No associació amb alteració lipídica o RI	110
IL-1β	Resposta immunitària	3954 C>T	243 VIH (90 LD)	Al·lel T menys freqüent en pacients amb LD	97
Lamina	Proteïna nuclear	Exó 8	21 VIH amb LD	No associació amb LD	111
HLA-B		HLA-B*4001	103 VIH (48 amb LD)	Aparició de lipoatròfia en pacients tractats amb d4T (especificitat 95.8% i valor predictiu positiu 88.9%)	112
Polimerasa gamma	Síntesis de ADNmt	E1143 (PNS en aquest aminoàcid)	69 VIH amb LD	Més freqüent en pacients amb LD	98

Apo: apolipoproteïna; CT: colesterol total; HDL: lipoproteïna d'alta densitat; IL-: interleuquina; IP: inhibidor de la proteïnaasa; LA: lipoatròfia; LD: lipodistròfia; LH: lipohipertròfia; LPL: lipoproteinlipassa; PNS: polimorfisme de nucleòtid simple; PPARγ: Peroxisome proliferators-activated receptor gamma; RI: resistència a la insulina; RTV: ritonavir; SREBP: Sterol-regulatory-element-binding-protein-1; TARGA: tractament antiretroviral de gran activitat; TG: triglicèrids; VLDL: very low-densitiu lipoproteïns.

La present Tesi Doctoral pretén estudiar l'efecte de les variacions genètiques de dues proteïnes fisiopatològicament implicades en la LD i els trastorns metabòlics associats com són la IL-6 i el PPARγ, en pacients infectats pel VIH en tractament amb TARGA. A més, es presenten resultats sobre la implicació de la proteïna Lipina 1 en la LD.

6. LIPINA

6.1. Funcions

La lipina és una proteïna que pertany a la família de proteïnes lipina, formada per 3 membres, la lipina-1, la lipina-2 i la lipina-3, siguent la més important i coneguda la lipina-1. El gen *LPIN1* es va descriure per primera vegada com un gen mutat en un model de distròfia hepàtica grassa de ratolí i el dèficit de lipina es va identificar com a causa de lipodistròfia, RI, neuropatia perifèrica i fetge gras neonatal. La lipina-1 s'expressa majoritàriament en teixit adipós, múscul esquelètic i testicles.

S'han establert 2 mecanismes d'acció de la lipina-1: 1) activitat enzimàtica fosfatidat fosfatasa responsable de la síntesis de triglicèrids i fosfolípids; 2) factor coactivador o regulador transcripcional de gens relacionats amb la diferenciació adipocitària (PPAR γ i C/EBP α), síntesi i dipòsit de lípids i oxidació d'àcids grassos. S'ha descrit que té un paper regulador en l'expressió de gens adipogènics durant les fases inicials de la diferenciació adipocitària així com en l'expressió del fenotip adipocitari madur (113-115).

Un estudi *in vitro* en preadipòcits ha demostrat el paper clau que juga la lipina, mitjançant l'activació i interacció amb els factors de transcripció PPAR γ i C/EBP α , tant en l'adipogènesis com en el manteniment de la funcionalitat de l'adipòcit madur (115)

En models de ratolí, l'absència o inactivitat de la lipina-1 s'associa resistència a la insulina i lipodistròfia caracteritzada per la presència d'adipòcits immadurs amb incapacitat per emmagatzemar lípids o expressar marcadors de maduració adipocitària, relacionat tant amb una pèrdua d'activitat enzim fosfatidat fosfatasa com a una manca d'activació de PPAR γ . En aquest mateix model de ratolí, l'excès de lipina-1 promou obesitat i sensibilitat a la insulina (113).

6.2. Estudis en humans no infectats pel VIH

Diversos estudis en humans han confirmat la correlació positiva entre els nivells de lipina-1 en teixit adipós i la sensibilitat a la insulina tant en individus primers com obesos (113). L'expressió de lipina-1 en teixit adipós també s'ha correlacionat de forma positiva amb l'expressió de PPAR α i

múltiples enzims relacionats amb l'oxidació d'àcids grassos en teixit adipós i s'ha correlacionat negativament amb mesures d'adipositat (massa total, visceral i subcutani de teixit adipós i l'índex de massa corporal), els àcids grassos lliures i el tamany de l'adipòcit (114).

6.3. Estudis en pacients amb infecció pel VIH

Fins l'actualitat únicament s'ha determinat l'expressió d'ARNm de lipina en teixit adipós en un estudi en el qual els nivells de lipina van ser inferiors en pacients amb LD que en pacients sense. Es va trobar una correlació negativa entre l'expressió de lipina i la de citoquines inflamatòries (IL-6, IL-8 i IL-18) (70).

Atès que la lipina té un paper important en el metabolisme lipídic i la diferenciació adipocitària i la disminució de la seva funció s'ha relacionat amb un fenotip de LD en models animals, sembla interessant estudiar si en la LD associada al VIH existeixen alteracions en la seva expressió o funcionalitat.

7. INTERLEUQUINA-6 (IL-6)

7.1. Funcions

La IL-6 és una citoquina multifuncional proinflamatòria amb un paper clau en la resposta immunitària innata i adaptativa. Entre les seves funcions metabòliques destaquen: regulació a la baixa de la lipoproteinlipasa i dipòsits de triglicèrids en teixit adipós, reducció de la diferenciació adipocitària i inducció d'insulinresistència. El TNF- α és un potent inductor de la seva secreció. Té un paper important en el desenvolupament i desestabilització de la placa d'aterosclerosi mitjançant l'alliberació d'altres citoquines proinflamatòries i mediadors protrombòtics, oxidació de lipoproteïnes per fosfolipases, estimulació de la secreció de proteïnes de fase aguda i activació de metaloproteïnasses. (116,117).

7.2. Estudis en humans no infectats pel VIH

Estudis realitzats en humans han demostrat que la seva concentració plasmàtica està incrementada en la obesitat i la diabetes mellitus tipus 2, i existeix una correlació entre els nivells plasmàtics d'IL-6, l'índex d'adipositat i la RI (116). També s'ha demostrat una associació significativa entre els nivells d'IL-6 i el risc de cardiopatia isquèmica (118).

7.3. Estudis en pacients infectats pel VIH

Hi ha força estudis en pacients amb infecció pel VIH que han involucrat aquesta citoquina en l'etiopatogènia de la LD. Així, s'ha detectat de forma quasi constant en diversos estudis, una elevació de l'expressió d'ARNm d'IL-6 en teixit adipós en pacients amb LD (53,59,60,62). Pel que fa als nivells plasmàtics d'IL-6, els resultats són discordants. Mentre que en la majoria de treballs no s'han detectat diferències en els nivells plasmàtics entre els 2 grups (LD vs no LD) (61,67,68,71), en un estudi els nivells han estat més elevats en pacients amb LD (72). La discordància entre l'expressió d'IL-6 en greix i els seus nivells plasmàtics pot ser deguda a l'acció autocrina i paracrina de la citoquina en el teixit adipós. A més a més la curta vida mitja (<2 hores) de la IL-6 junt amb una gran variabilitat intraindividual, poden dificultar la seva determinació al laboratori.

S'ha demostrat una correlació negativa entre l'expressió en teixit adipós d'IL-6 i de C/EBP α i positiva amb el grau d'apoptosi i l'alliberació de TNF- α pel teixit adipós, així com amb marcadors de RI (HOMA, insulina en dejuni) (53). La secreció IL-6 pel greix subcutani abdominal també s'associa positivament amb la quantitat de teixit adipós visceral i negativament amb el percentatge de greix en cames (72). En resum, aquestes troballes evidencien que la IL-6 té un paper important en la etiopatogènia de la LD i les seves complicacions.

7.4. Associació entre el polimorfisme -174 G>C de la IL-6 i alteracions del metabolisme

El gen de la IL-6 està localitzat en el cromosoma 7p21. S'han descrit diversos polimorfismes en la regió promotora del gen de la IL-6. El més estudiat és el PNS sinònim -174 G>C localitzat en la regió promotora del gen de la IL-6. L'al·lel C s'ha associat a menor transcripció d'IL-6 (119). La

relació entre aquest polimorfisme i diferents trastorns metabòlics en la població general ha estat analitzada en múltiples estudis i els resultats són poc concloents i, sovint, contradictoris. En general els estudis mostren una tendència a que els genotips *GG* i *GC* s'associïn a major IMC, RI i dislipèmia (120,121), tot i que altres estudis no ho confirmen (122) o, fins i tot, ho contradueixen (123,124).

Recentment s'ha publicat un estudi d'associació genètica que no troba relació entre el PNS *-174 G>C* de la *IL-6* i alteració lipídica o RI en pacients VIH (110).

8. PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR GAMMA (PPAR γ)

8.1. Funcions

Els receptors proliferadors activats dels peroxisomes (en anglès, peroxisome proliferator-activated receptors [PPARs]) són receptors nuclears que pertanyen a la superfamília de receptors esteroides. Es coneixen 3 subtipus, el PPAR α , δ i γ . El PPAR γ s'expressa principalment en el teixit adipós i, en nivells menors, en múscul, pàncrees, fetge, cor, colon i macrofàgs. El PPAR γ , té 4 isoformes, la isoforma PPAR γ 2 és específica del teixit adipós i té un paper cabdal en la diferenciació adipocitària, induïnt l'expressió de gens específics de l'adipòcit (proteïnes essencials per la captació adipocitària d'àcids grassos i la lipogènesi) i promovent la formació d'adipòcits madurs carregats de lípids. Tambè regula l'expressió de determinades adipocitoquines com són la leptina, l'adiponectina (augmenta l'expressió) i el TNF- α (disminueix l'expressió). Té una funció antiinflamatòria a nivell dels macròfags del teixit adipós. Exerceix la seva acció regulant la transcripció de determinats gens i per actuar requereix formar un heterodímer amb el *9cis*-retinoic àcid receptor (RXR). El PPAR γ coopera amb altres famílies de factors de transcripció com el C/EBPs i el SREBP-1 per regular la diferenciació adipocitària (125,126).

Les tiazolidinediones (TZD) són lligands sintètics d'alta afinitat i amb potent capacitat per activar el PPAR γ . L'activació suprafisiològica de PPAR γ per TZD produeix un increment del contingut de TG en el teixit adipós blanc, reduïnt el contingut de TG en fetge i múscul, disminuïnt així la

resistència a la insulina. S'ha demostrat en pacients amb formes familiars de lipoatròfia que les TZD augmenten el contingut de teixit adipòs subcutani. En canvi, en pacients amb LA induïda per TARGA no s'ha objectivat un increment evident de teixit adipòs, probablement per l'efecte nociu continuat del TARGA (127).

8.2. Estudis en pacients amb infecció pel VIH

Diversos estudis han documentat una disminució en l'expressió d'ARNm de PPAR γ en teixit adipòs subcutani de pacients amb LD en relació a pacients sense LD i individus no infectats pel VIH. Aquesta disminució de l'expressió de PPAR γ es correlaciona amb un augment de l'expressió de citokines proinflamatòries com la IL-6 i el TNF- α i una disminució tant de l'expressió en teixit adipòs com de nivells plasmàtics d'adiponectina (53,59,60). A més a més, pacients infectats pel VIH naïves també presenten una disminució en l'expressió PPAR γ en teixit adipòs (83). Per tant es pot concloure que tant el propi VIH, probablement a través de les proteïnes virals Vpr i Nef que han demostrat capacitat de suprimir l'activitat del PPAR γ (84,85), com el TARGA (estudis *in vitro* en preadipòcits han mostrat una disminució en l'expressió de PPAR γ sota l'efecte d'alguns IP i INTI) interactuarien per interferir en la seva activitat (54-57, 128).

8.3. Associació entre polimorfismes del gen *PPAR γ* i alteracions del metabolisme

El gen del *PPAR γ* està localitzat al cromosoma 3p25 i conté 9 exons. La producció de PPAR γ està parcialment determinada genèticament. S'han identificat diferents variants genètiques de *PPAR γ* , i la més àmpliament estudiada és la variant *Pro12Ala*. Aquesta mutació no sinònima, localitzada en l'exó 2, dona lloc a un canvi de prolina per alanina. És relativament comú en població caucàsica, amb una freqüència al·lèlica que varia entre el 2 i el 21,6% segons la població estudiada (129,130). Estudis *in vitro* han demostrat que la variant *Ala* s'associa a una disminució de l'activitat transcripcional i adipogènica, que es podria traduir en una menor acumulació de massa de teixit adipòs (131) Estudis d'associació genètica en la població general han relacionat la variant *Pro12Ala* amb un menor risc de DM tipus 2, major sensibilitat a la insulina i menor

lipolisis (130,132-135). Una variant genètica de *PPAR γ* localitzada en el promotor 4 i el PNS *161C>T* s'han associat a síndrome coronària aguda (136). Per un altre costat, algunes mutacions rares que provoquen una pèrdua de funció en el gen del *PPAR γ* poden causar una forma familiar de lipodistròfia parcial que s'associa a RI i dislipèmia (137). Atès que moltes d'aquestes característiques coincideixen amb la LD associada al TARGA, sembla biològicament plausible investigar si variants genètiques del *PPAR γ* s'associen a LD i/o alteracions metabòliques en pacients amb infecció pel VIH amb TARGA. Fins l'actualitat només un estudi ha analitzat la mutació *161C>T* del gen del *PPAR γ* en pacients amb infecció pel VIH en tractament amb TARGA, no detectant-se associació amb la LD o les alteracions metabòliques associades (95).

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Estudi 1: **Human subcutaneous adipose tissue LPIN1 expression in obesity, type 2 diabetes, and human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy syndrome**

Hipòtesis

La lipina pot estar implicada en el desenvolupament de la LD associada al TARGA en pacients VIH. Aquesta hipòtesis es basa en estudis *in vitro*, en models animals i en pacients no infectats pel VIH en els que es demostra la implicació de la lipina en el procés de diferenciació de l'adipòcit.

Objectius

L'objectiu primari fou investigar l'expressió de *LPIN1* en teixit adipós de pacients amb LD associada al TARGA

Els **objectius secundaris** foren:

- a) Avaluar la correlació entre l'expressió de *LPIN1* en teixit adipós i factors de transcripció adipogènics
- b) Avaluar la correlació entre l'expressió de *LPIN1* en teixit adipós i citoquines proinflamatòries
- c) Avaluar la correlació entre l'expressió de *LPIN1* en teixit adipós i la sensibilitat a la insulina

Estudi 2: **The IL-6 system in HIV-1-infection and in HAART-related fat redistribution syndromes**

Hipòtesis

La IL-6 pot estar implicada en la LD associada al TARGA en pacients VIH i els seus determinants genètics poden modular la seva aparició.

Aquesta hipòtesis es basa en estudis que demostren un increment de l'expressió d'IL-6 en teixit adipós subcutani en pacients infectats pel VIH que presenten LD. Variants genètiques de la IL-6 s'han associat a trastorns metabòlics com són la DM i dislipèmia.

Objectius

Els **objectius primaris** han estat avaluar la possible relació entre el polimorfisme *-174 G>C* de la *IL-6* i la LD associada al TARGA en una cohort de pacients infectats pel VIH i analitzar la concentració plasmàtica i l'expressió d'*IL-6* en teixit adipós subcutani en pacients amb i sense LD.

Els **objectius secundaris** han estat:

- a) Avaluar la distribució d'aquest polimorfisme en població espanyola infectada i no infectada pel VIH.
- b) Analitzar la influència del polimorfisme *-174 G>C* de la *IL-6* sobre l'expressió de ARNm d'IL-6 en teixit adipós subcutani i els nivells plasmàtics d'IL-6.
- c) Analitzar la influència del polimorfisme *-174 G>C* de la *IL-6* sobre el metabolisme lipídic i dels carbohidrats.

Estudi 3: ***PPAR γ Pro12Ala* polymorphism in HIV-1-infected patients with HAART-related lipodystrophy**

Hipòtesis

El *PPAR γ* pot estar implicat en el desenvolupament de la LD associada al TARGA en pacients VIH i els seus determinants genètics poden modular la seva aparició.

Aquesta hipòtesis es basa en estudis previs en pacients no infectats pel VIH i estudis *in vitro* que demostren un paper cabdal del *PPAR γ* en el procés de diferenciació de l'adipòcit i en estudis en pacients amb infecció pel VIH amb LD en els que s'ha observat una disminució de l'expressió de *PPAR γ* en teixit adipós subcutani. Ademés, variants genètiques de *PPAR γ* s'han associat a formes familiars de LD i a trastorns metabòlics.

Objectius

Els **objectius primaris** foren avaluar la possible relació entre el polimorfisme *Pro12Ala* del *PPAR γ* i la LD associada al TARGA en una cohort de pacients infectats per VIH i analitzar l'expressió de *PPAR γ* en teixit adipós subcutani de pacients amb i sense LD.

Els **objectius secundaris** han estat:

- a) Avaluar la distribució d'aquest polimorfisme en població espanyola infectada i no infectada pel VIH.
- b) Analitzar la influència del polimorfisme *Pro12Ala* del *PPAR γ* sobre l'expressió de *PPAR γ* en teixit adipós subcutani
- c) Analitzar la influència del polimorfisme *Pro12Ala* del *PPAR γ* sobre el metabolisme lipídic i dels carbohidrats.

PUBLICACIONS

ESTUDI 1

ORIGINAL ARTICLE

Human subcutaneous adipose tissue *LPIN1* expression in obesity, type 2 diabetes mellitus, and human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy syndrome

Mercé Miranda^a, Matilde R Chacón^a, José Gómez^b, Ana Megía^a, Victòria Ceperuelo-Mallafré^a, Sergi Veloso^c, Maria Saumoy^c, Lluís Gallart^a, Cristóbal Richart^d, José Manuel Fernández-Real^e, Joan Vendrell on Behalf of the Adipocyte Differentiation Study Group (Francesc Vidal, Cristina Gutiérrez, Enric Caubet, Carles Masdevall, Núria Vilarrasa)..

(a) Departament de Recerca. Unitat d'Endocrinologia i Diabetes. Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona

(b) Unitat d'Endocrinologia i Diabetes. Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona

(c) Servei de Medicina Interna Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona

(d) CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutrición (CB 06/03). Servei de Medicina Interna Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII

(e) Unitat d'Endocrinologia i Diabetes. Hospital Universitari Josep Trueta. Girona

Metabolism Clinical and Experimental 2007; 56:1518-1526

Factor d'impacte 2.9



Available online at www.sciencedirect.com



Metabolism Clinical and Experimental 56 (2007) 1518–1526

Metabolism
Clinical and Experimental

www.elsevier.com/locate/metabol

Human subcutaneous adipose tissue *LPIN1* expression in obesity, type 2 diabetes mellitus, and human immunodeficiency virus–associated lipodystrophy syndrome

Merce Miranda^a, Matilde R. Chacón^a, José Gómez^b, Ana Megía^a, Victòria Ceperuelo-Mallafre^a, Sergi Veloso^c, María Saumoy^c, Lluís Gallart^a, Cristóbal Richart^d, Jose Manuel Fernández-Real^c, Joan Vendrell^{a,*},

on behalf of the Adipocyte Differentiation Study Group (see appendix for group members)

^aResearch Department, Endocrinology and Diabetes Unit, University Hospital of Tarragona Joan XXIII, "Pere Virgili" Institute, University Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain

^bEndocrinology and Diabetes Unit, University Hospital of Bellvitge, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain

^cInternal Medicine Service, University Hospital of Tarragona Joan XXIII, 43007 Tarragona, Spain

^dInternal Medicine Service, University Hospital of Tarragona Joan XXIII, 43007 Tarragona, CIBER of Obesity Physiopathology and Nutrition (CB06/03), Carlos III Health Institute, Spain

^eEndocrinology and Diabetes Unit, University Hospital "Josep Trueta," 17007 Girona, CIBER of Obesity Physiopathology and Nutrition (CB06/03/010), Carlos III Health Institute, Spain

Received 31 December 2006; accepted 20 June 2007

Abstract

The aim of this study was to analyze *LPIN1* adipose tissue gene expression levels in 3 clinical insulin-resistant conditions—obesity, type 2 diabetes mellitus, and human immunodeficiency virus (HIV)-associated lipodystrophy—and its relationship with adipogenic and inflammatory markers. Subcutaneous adipose tissue samples were obtained from 2 cohorts: 98 subjects with different degrees of adiposity and with or without the presence of type 2 diabetes mellitus and 37 HIV-infected patients. Real-time polymerase chain reaction was used to measure gene expression of *LPIN1* and adipogenic (*PPAR* γ , *SREBP1c*) and inflammatory markers (*IL6*, *TNF* α , *TNFR1*, and *TNFR2*). *LPIN1* messenger RNA expression levels were significantly lower in the obese group ($P = .002$), were similar in type 2 diabetes mellitus patients and control subjects ($P = .211$), and were significantly higher in HIV-infected patients ($P < .001$). *LPIN1* messenger RNA levels positively correlated with insulin sensitivity in all subjects. Moreover, an inverse correlation with proinflammatory cytokines was observed. © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity is a major risk factor for insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, heart disease, dyslipidemia, and many other chronic diseases. Paradoxically, lipodystrophy, a condition involving body fat redistribution (central adiposity and peripheral fat wasting), is associated with morbidity normally found in obesity [1]. Both pathologies are characterized by metabolic abnormalities such as hyperlipidemia and insulin resistance.

LPIN1 gene is an important determinant of adipose tissue differentiation and fat cell function, found to participate before *PPAR* γ during adipocyte differentiation [2]. It was first described as the mutated gene in the mouse model for fatty liver dystrophy (*fld*) [3]. Mice carrying mutations in the *fld* gene have features of human lipodystrophy [4]. In mouse models, lipin (*LPIN1* protein) absence or inactivity can cause lipodystrophy; but enhanced adipose tissue-specific *LPIN1* levels in transgenic mice promotes obesity and insulin sensitivity [5]. Lipin is phosphorylated in response to insulin by the mammalian target of rapamycin (a Ser/Thr kinase), although the effects of this phosphorylation are unknown [6]. The mammalian target of rapamycin seems to have evolved as a sensor of nutrient availability, and it is involved in insulin-stimulated glucose disposal and directs cellular

* Corresponding author. Secció d'Endocrinologia, Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, C/Dr Mallafre Guasch, 4. 43007 Tarragona, Spain. Tel.: +34 977295823; fax: +34 977295823.

E-mail address: jvo@comt.es (J. Vendrell).

growth and proliferation [6]. Whether lipin is a primary regulator of these functions remains to be studied.

Recently, lipin homolog molecular function has been identified as a phosphatidate phosphatase (PAP) in *Saccharomyces cerevisiae*, the enzyme responsible for the synthesis of 1,2-diacylglycerol from phosphatidate acid (PA), involving *LPINI* directly in the synthesis of triglyceride in the adipocyte [7]. This activity is almost lost in *fld/fld* mice; therefore, *LPINI* is a major phosphatidate phosphatase (PAP) in vivo in several tissues [8]. Donkor et al [9] showed that *LPINI* accounts for all of the PAP type 1 activity in white and brown adipose tissue in mice [9]. Moreover, the tissue *LPINI* expression patterns observed in mice and humans are similar.

Lipin activity is not affected by the phosphorylation state of the protein. Conversely, changing subcellular localization (soluble or membrane bound) is a major mechanism for controlling lipin function. Because insulin increases triacylglycerol (TAG) synthesis but decreases the membrane-bound lipin form (the more active form in TAG synthesis), perhaps changes in lipin localization have roles related to different functions of PA not involving TAG synthesis [8]. Phosphatidate acid is a lipid that could act as a second messenger in pathways that regulate cellular size and proliferation, insulin sensitivity, and glucose homeostasis [10,11].

Regarding human obesity, very few reports on human *LPINI* gene expression have been performed, suggesting a positive association with insulin sensitivity [12–14] and a negative one with body mass index (BMI) [13,14]. On the other hand, human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients who developed lipodystrophy had lower *LPINI* messenger RNA (mRNA) levels than those without lipodystrophy, in line with findings in the *fld* animal model [15]. Likewise, inflammation has been claimed as being a common disturbance participating in the insulin resistance state observed in obesity, type 2 diabetes mellitus, and HIV-associated lipodystrophy syndrome (HALS), with a key role for a hyperactivity of the tumor necrosis factor (TNF) α system, raised in part by the adipose tissue [16,17].

Here we further investigated the adipose tissue expression of the human *LPINI* gene in 3 clinical insulin-resistant conditions—obesity, type 2 diabetes mellitus, and HIV-associated lipodystrophy—and its relationship with adipogenic and inflammatory markers.

2. Methods

2.1. Subjects

2.1.1. Obesity and type 2 diabetes mellitus cohort

A group of 98 subjects was recruited at the University Hospital Joan XXIII (Tarragona, Spain). All were white and reported that their body weight had been stable for at least 3 months before the study. They had no systemic disease other than obesity or type 2 diabetes mellitus, and all were free of any infections in the month before the study. Liver and renal diseases were specifically excluded by biochemical workup.

Table 1A

Obesity study: characteristics of the population

	Control subjects (n = 24)	Obese subjects (n = 22)
Age (y)	55.83 \pm 15.48	47.23 \pm 12.90 *
Sex (female-male)	7:17	17:5 **
BMI (kg/m ²)	25.20 \pm 2.90	44.24 \pm 11.26 ***
WHR	0.92 \pm 0.09	0.95 \pm 0.11
Insulin (μ U/mL)	3.77 \pm 2.64	7.32 \pm 4.92 *
Fasting glucose (mmol/L)	5.56 \pm 0.91	5.57 \pm 0.77
Cholesterol (mmol/L)	5.09 \pm 1.22	5.27 \pm 0.74
Glycerol (μ mol/L)	383.38 \pm 171.74	324.76 \pm 163.72

* $P < .05$.

** $P < .01$.

*** $P < .001$.

Obesity was considered positive if BMI was higher than 30 kg/m² according to the World Health Organization criteria [18]. With this criterion, there were 24 nonobese and 22 obese nondiabetic subjects for the obesity study (Table 1A). Patients were classified as having type 2 diabetes mellitus according to the American Diabetes Association criteria, with a stable metabolic control in the previous 6 months defined by stable glycated hemoglobin values. According to these criteria, there were 52 type 2 diabetes mellitus subjects. Pharmacological treatment of the patients with type 2 diabetes mellitus was as follows: insulin, 25%; oral hypoglycemic agents, 66.6%; statins, 58.3%; fibrates, 10.6%; and blood pressure-lowering agents, 53.8%. No patient was on thiazolidinedione therapy.

We compared the 22 nondiabetic obese with the 26 type 2 diabetes mellitus obese subjects for the study of type 2 diabetes mellitus, matched for BMI (Table 2A).

The hospital's ethics committee approved the study, and informed consent was obtained from all participants.

2.1.2. HALS cohort

Thirteen HIV-positive patients receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) without lipodystrophy (HIV⁺ HALS⁻) and a group of 24 HIV-positive patients who developed lipodystrophy under HAART therapy (HIV⁺ HALS⁺) were recruited by the Internal Medicine Service of the Hospital Universitari Joan XXIII.

Lipodystrophy was defined by severe fat wasting from the face, buttocks, limbs, and upper trunk with or without central adiposity, buffalo hump, or breast hypertrophy in women according to previously defined criteria [19,20].

As a control group for the HIV-positive cohort, 21 subjects with a mean BMI of 24.66 \pm 2.66 kg/m² were recruited by the endocrinology service of the University Hospital Joan XXIII (Tarragona, Spain). All subjects were white and reported that their body weight had been stable for at least 3 months before the study. Exclusion criteria included the following: (1) clinically significant hepatic, neurologic, or other major systemic disease, including malignancy; (2) history of drug or alcohol abuse, defined as >80 g of alcohol intake per day in men and >40 g of alcohol intake per day in women, or serum transaminase activity more than twice the normal upper limit;

(3) an elevated serum creatinine concentration; (4) an acute major cardiovascular event in the previous 6 months; and (5) acute illnesses and current evidence of acute or chronic inflammatory or infective diseases.

The hospital's ethics committee approved the study and informed consent was obtained from all participants.

2.2. Anthropometric measurements

Body mass index was calculated as weight (in kilograms) divided by height (in meters) squared. Waist circumference was measured midway between the lowest rib margin and the iliac crest. Hip circumference was determined as the widest circumference measured over the greater trochanter. Waist-to-hip ratio (WHR) was calculated accordingly.

2.3. Insulin sensitivity study

In HIV-positive patients ($n = 37$), insulin sensitivity (S_I) and glucose effectiveness were measured using the frequently sampled intravenous glucose tolerance test. In brief, the experimental protocol started between 8:00 and 8:30 AM after an overnight fasting. A butterfly needle was inserted into an antecubital vein, and patency was maintained with a slow saline drip. Basal blood samples were drawn at -30 , -10 , and -5 minutes, after which glucose (300 mg/kg body weight) was injected over 1 minute starting at time 0 and insulin (Actrapid; Novo, Bagsvaerd, Denmark; 0.03 U/kg) was administered at time 20. Additional samples were obtained from a contralateral antecubital vein during 3 hours as previously described [21].

2.4. Analytical methods

Blood samples were drawn from each subject before breakfast, between 8:00 and 9:00 AM, after an overnight rest in bed. Plasma and serum samples were stored at -80°C until analytical measurements were performed, except for glucose and glycated hemoglobin, which were determined immediately after blood was drawn.

Serum glucose was measured with a glucose oxidase method using a glucose analyzer YSI 2300 STAT Plus (YSI, Yellow Springs, OH). Lipid profile (triglycerides, total cholesterol, and high-density lipoprotein cholesterol) was measured by usual enzymatic methods.

Soluble TNF receptor 1 (sTNFR1) and 2 (sTNFR2) were determined by solid phase enzyme immunoassay with amplified reactivity (Bio Source Europe, Nivelles, Belgium). The detection limit was 50 ng/mL for sTNFR1 and 0.1 ng/mL for sTNFR2; and the intra- and interassay coefficients of variation (CVs) were $<7\%$ and $<9\%$, respectively. The sTNFR1 assay does not cross-react with sTNFR2. TNF α does not interfere with the assay. Levels of plasma interleukin 6 (IL6) were measured by the highly sensitive quantitative sandwich enzyme immunoassay technique with the Human IL6 Quantikine HS ELISA Kit (R&D Systems, Oxon, UK). The mean of the minimum detectable concentration was 0.039 pg/mL. Intra- and interassay CVs were $<9.8\%$ and

$<11.2\%$, respectively. Plasma high-sensitivity C-reactive protein was measured by a highly sensitive immunonephelometry kit (Dade Behring, Marburg, Germany). Serum adiponectin concentrations were measured by radioimmunoassay (Linco Research, St Charles, MO). The intra- and interassay CVs were $<5\%$. Serum insulin was measured by radioimmunoassay (Coat-A-Count Insulin; DPC, Los Angeles, CA). Intraassay CV was 6.6%.

2.5. Adipose tissue samples

Adipose tissue samples were obtained from subcutaneous abdominal depots. In the obese and type 2 diabetes mellitus study, samples were obtained during elective abdominal surgical procedures (gastric bypass operation, cholecystectomy, or surgery for abdominal hernia). All patients had fasted overnight; and at the beginning of surgery, 2 to 4 g of subcutaneous fat tissue was removed from each proband and immediately introduced in RNALater (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). In the HALS study, 1 to 2 g of subcutaneous fat tissue was removed by scalpel from each proband, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until RNA extraction.

2.6. Total RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was extracted from 400 to 500 mg of frozen subcutaneous adipose tissue using RNeasy Lipid Tissue Midi Kit (Qiagen Science, Germantown, MD) following manufacturer's instructions. Total RNA was quantified by absorbance measurement, and its purity was assessed by the $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ratio.

One microgram of RNA was retrotranscribed to complementary DNA (cDNA) using the Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI) in a final volume of 20 μL containing 1 \times reverse transcriptase buffer (10 mmol/l Tris-HCl [pH 9.0], 50 mmol/l KCl, 0.1% Triton X-100), 1 mmol/l of each deoxy nucleotide tri-phosphate (dNTP), 1 U/ μL Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, 18 U/ μg RNA AMV Reverse Transcriptase, and 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ RNA of random primers. The cDNA reaction was incubated for 15 minutes at 25°C followed by 60 minutes at 42°C and heated for 5 minutes at 95°C .

2.7. Real-time quantitative PCR

2.7.1. Primers

Primer pairs were spanning exon-exon junctions and were therefore mRNA/cDNA specific. The following primers were used: 5'-ttccacgtccgcttggg-3' and 5'-gtggccaggtcataggg-3' for *LPIN1*; 5'-ctatgaggtcatgctgtg-3' and 5'-gtactgacatttatt3' for *PPAR γ* ; 5'-aaggtgaagtcggcgcg-3' and 5'-atcggggctggcaggg-3' for *SREBP1c*; 5'-gagcactgaaagcatgac-3' and 5'-gctgttatctctcagctcca-3' for *TNF α* ; 5'-cggtggaagtcgaagctcta-3' and 5'-tctaggtctgtgctgtg-3' for *TNFR1*; 5'-ggaaactcaagctgcactc-3' and 5'-ggatgaagtcgtgtggaga-3' for *TNFR2*; and 5'-cggatcacctcagcgg-3' and 5'-tgatgatttaccaggc-3' for *IL6*. The housekeeping genes used to normalize gene

Table 1B
 Obesity study: gene expression levels (arbitrary units)

	Control subjects (n = 24)	Obese subjects (n = 22)
<i>LPIN1</i>	3.13 ± 2.31	1.54 ± 1.18 *
<i>PPARγ</i>	4.58 ± 4.21	6.81 ± 8.17
<i>SREBP1c</i>	4.14 ± 4.32	2.44 ± 3.04
<i>IL6</i>	2.36 ± 1.48	24.64 ± 24.21 **
<i>TNFα</i>	0.18 ± 0.15	0.67 ± 0.69 **
<i>TNFR1</i>	3.95 ± 2.80	2.27 ± 1.32 ***
<i>TNFR2</i>	5.24 ± 3.64	6.64 ± 4.35

* $P = .002$.

** $P < .01$.

*** $P < .05$.

expression were β -actin 5'-ggacttcgagcaagatgg-3' and 5'-agcactgttgccgtacag-3' and cyclophilin A 5'-caaatgctg-gaccaaac-3' and 5'-gcctccacaatattcatgcttctt-3'.

LPIN1 primers do not differentiate the α or β isoforms previously described [22]. All primers were synthesized by Sigma (Sigma-Genosys, Haverhill, United Kingdom).

2.7.2. Real-time PCR

Gene expression analysis was performed on a LightCycler Instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) using the SYBR green fluorescence method. Quantification of 2 μ L of the cDNA was performed on a volume of 20 μ L of a mixture containing 0.3 μ mol/L of primers (except for β -actin, *TNFα*, *TNFR1*, and *TNFR2*, which were 0.5 μ mol/L, and for *LPIN1*, which was 0.2 μ mol/L) and 2 μ L of LC-FastStart DNA Master SYBR green I (Roche) on a volume of 20 μ L. The final concentration of $MgCl_2$ was adjusted for each gene.

The purity of each amplified product was confirmed by melting curve analysis, and detection of the fluorescent signal was adjusted to avoid primer-dimer detection.

2.7.3. Results analysis

For each sample, the derived gene quantification was calculated from an external standard curve, created with serial dilutions of a cloned PCR fragment from the respective gene, using LightCycler Software version 3.5 (Roche).

Adipose tissue expression levels of each gene were normalized using β -actin (obesity and type 2 diabetes mellitus cohort) and both β -actin and cyclophilin A (HALS cohort). Statistical analysis showed no differences in gene expression for these housekeeping genes among the studied groups.

2.8. Statistical analysis

Sample size was calculated to achieve a difference in logarithm of *LPIN1* mRNA mean levels between the studied groups of 0.3 or greater with a confidence level of 95% and a statistical power of 80%.

Statistical analysis was performed by using the SPSS/PC+ statistical package (version 13.5 for Windows; SPSS, Chicago, IL). Data are expressed as mean value \pm SD.

Differences in concentrations and in clinical or laboratory parameters between groups were compared by using either an independent-samples *t* test or analysis of variance when

appropriate. Variables that did not have a Gaussian distribution were logarithmically transformed to perform statistical analysis or were analyzed with nonparametric tests. Differences in sex and in retroviral use between studied groups were analyzed by Pearson/Fisher χ^2 test. The relation between variables was tested using Pearson/Spearman correlation analysis and stepwise multiple linear regression analysis. Statistical significance occurred if a computed 2-tailed probability value was less than .05.

3. Results

3.1. Obesity and type 2 diabetes mellitus studies

3.1.1. Subcutaneous adipose tissue gene expression in obese subjects

The main anthropometric and analytical characteristics of the nondiabetic cohort are shown in Table 1A. Obese patients were slightly younger than nonobese subjects, and they were predominantly women.

The expression of *LPIN1*, *PPARγ*, and *SREBP1c* in subcutaneous adipose tissue in nonobese and obese subjects is shown in Table 1B. *LPIN1* mRNA expression levels were significantly lower in the obese group ($P = .002$). *SREBP1c* mRNA levels of obese subjects show a trend toward being lower than that in nonobese subjects, and no differences were found in *PPARγ* mRNA expression between the studied groups.

3.1.2. Subcutaneous adipose tissue gene expression in patients with type 2 diabetes mellitus

The main anthropometric and analytical characteristics of the population selected for the study of subcutaneous gene expression in type 2 diabetes mellitus (obese subjects) are described in Table 2A. The groups were matched for sex, BMI, and WHR.

LPIN1 subcutaneous adipose tissue mRNA expression (Table 2B) showed no differences between type 2 diabetes mellitus patients and control subjects ($P = .211$).

3.1.3. Correlation and regression analysis

We performed a linear correlation analysis between the studied genes and anthropometric and analytical data. The

Table 2A
 Type 2 diabetes mellitus study: characteristics of the population

	Subjects without diabetes (n = 22)	Patients with type 2 diabetes mellitus (n = 26)
Age (y)	47.23 ± 12.90	56.42 ± 11.87 *
Sex (female-male)	17:5	18:8
BMI (kg/m ²)	44.24 ± 11.26	41.61 ± 9.40
WHR	0.95 ± 0.11	0.92 ± 0.07
Insulin (μ U/mL)	7.32 ± 4.92	9.27 ± 4.12
Fasting glucose (mmol/L)	5.57 ± 0.77	8.96 ± 2.50 **
Cholesterol (mmol/L)	5.27 ± 0.74	5.10 ± 1.24
Glycerol (μ mol/L)	324.76 ± 163.72	351.20 ± 217.34

* $P < .05$.

** $P < .001$.

Table 2B
 Type 2 diabetes mellitus study: gene expression levels (arbitrary units)

	Subjects without diabetes (n = 22)	Patients with type 2 diabetes mellitus (n = 26)
<i>LPIN1</i>	1.54 ± 1.18	1.91 ± 1.24
<i>PPARγ</i>	6.81 ± 8.17	10.80 ± 9.08
<i>SREBP1c</i>	2.44 ± 3.04	1.49 ± 1.11
<i>IL6</i>	24.64 ± 24.21	20.33 ± 26.30
<i>TNFα</i>	0.67 ± 0.69	0.54 ± 0.56
<i>TNFR1</i>	2.27 ± 1.32	5.05 ± 3.61 *
<i>TNFR2</i>	6.66 ± 4.35	5.36 ± 3.14

* $P = .001$.

independence of the associations was further evaluated by linear multiple regression analysis, considering all subjects ($n = 98$) as a whole, controlling for sex and presence of diabetes. In bivariate analysis, *LPIN1* mRNA expression levels correlated positively with age ($r = 0.296$, $P = .003$) and *PPARγ* mRNA expression ($r = 0.223$, $P = .044$) and negatively with BMI ($r = -0.387$, $P < .001$) (Fig. 1A), cholesterol ($r = -0.251$, $P = .026$), plasma insulin ($r = -0.250$, $P = .024$), C-reactive protein ($r = -0.281$, $P = .016$), and *TNFR2* mRNA expression ($r = -0.212$, $P = .038$). In the multiple regression analysis, after adjusting for confounding variables, only plasma insulin levels ($\beta = -.613$, $P = .001$, 95% confidence interval [β] $-0.051/-0.014$) were maintained as a determinant of *LPIN1* mRNA levels in women ($n = 45$) (Fig. 1B).

3.2. HALS study

3.2.1. Clinical and biochemical characteristics of the study groups

Clinical, anthropometric, and analytical characteristics of the subjects studied are shown in Table 3A.

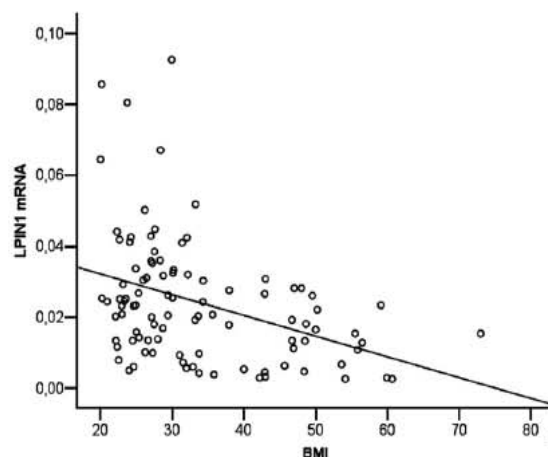
All HIV-positive groups had received HAART for 51.8 ± 18.29 months (range, 14–80 months), and the duration of antiretroviral combination therapy was comparable in HALS-negative and HALS-positive groups (Table 3A). Time of evolution to HALS was 24.41 ± 15.09 months. All patients in both HALS-negative and HALS-positive groups were currently receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). There were no significant differences between HALS groups in the frequency of receiving non-NRTIs (NNRTIs) and protease inhibitors (PIs).

There were no significant differences between HALS groups in the number of patients who received a specific agent, except for stavudine (Table 3A). Of the NRTI class of antiretroviral agents, lamivudine (33%) was the most frequently used in the HIV⁺ HALS⁻ group, and stavudine (26%) and lamivudine (24%) in the HIV⁺ HALS⁺ group. Of the NNRTIs, efavirenz was the most frequently used in both groups (60% and 68%, respectively). The most common PI in both groups was indinavir (37% and 32%, respectively). There were no significant differences in the length of treatment of each specific agent between groups.

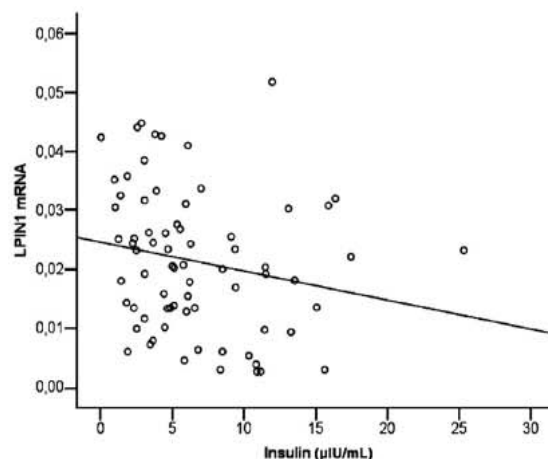
The HIV-positive subjects had higher levels of plasma IL6, and HALS-positive patients showed lower S_1 than the HALS-negative group. Adiponectin circulating levels were reduced in HALS-positive patients, although these levels did not reach statistical significance. Nevertheless, adiponectin levels were positively correlated with insulin sensitivity ($r = 0.616$, $P = .001$).

3.2.2. Subcutaneous adipose tissue gene expression

The mRNA expression levels of the different genes studied are shown in Table 3B. *LPIN1* mRNA levels were significantly higher in HIV-positive patients compared with controls, but there were no differences between both HIV-positive groups. We found significant differences in *LPIN1* mRNA levels between different families of HAART



A



B

Fig. 1. Linear correlation between *LPIN1* mRNA levels and BMI (A) or serum insulin concentration (B) in the obesity and type 2 diabetes mellitus cohort.

Table 3A
 HALS study: characteristics of the population

	HIV ⁻ (n = 21)	HIV ⁺ HALS ⁻ (n = 13)	HIV ⁺ HALS ⁺ (n = 24)
Age (y)	40.86 ± 11.20	39.79 ± 6.96	43.56 ± 8.97
Sex (female/male)	5/16	3/11	5/20
BMI (kg/m ²)	24.66 ± 2.66	23.44 ± 2.59	24.29 ± 2.79
WHR	0.90 ± 0.09	0.89 ± 0.09	0.95 ± 0.09
Fasting glucose (mmol/LM)	5.13 ± 0.56	5.00 ± 0.40	5.21 ± 0.98
Cholesterol (mmol/L)	5.14 ± 1.22	5.12 ± 0.69	5.58 ± 1.42
HDL cholesterol (mmol/L)	1.18 ± 0.38	1.31 ± 0.54	1.10 ± 0.33
LDL cholesterol (mmol/L)	ND	2.96 ± 0.78	3.08 ± 0.97
Triglycerides (mmol/L)	1.88 ± 1.93	2.15 ± 1.27	3.48 ± 2.55
Insulin (μIU/mL) *	3.37 ± 2.00	7.63 ± 3.98	11.79 ± 6.95
S ₁ **	ND	3.36 ± 0.95	2.17 ± 1.58
CD4 count (cells/mm ³)		628.69 ± 331.10	732.80 ± 292.65
HAART exposure (mo [range])		47.36 ± 29.98 (18-100)	54.32 ± 18.29 (14-80)
No. of patients receiving antiretroviral agents (n [%])		13 (100)	24 (100)
	NRTI	9 (69)	23 (96)
	Stavudine **	6 (46)	7 (29)
	NNRTI	7 (54)	17 (71)
	PI		
Plasma IL6 (ng/L) *	0.94 ± 1.09	2.68 ± 2.35	2.01 ± 1.20
Adiponectin (μg/mL)	ND	16.12 ± 10.69	13.36 ± 14.30
sTNFR1 (pg/mL) **	1.45 ± 0.84	2.09 ± 0.60	2.11 ± 1.04
sTNFR2 (ng/mL) **	4.52 ± 1.86	4.69 ± 1.57	6.25 ± 2.71

HDL indicates high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; ND, not determined.

* $P < .001$.

** $P < .05$.

therapy in the HALS-positive group (327 ± 205 in HAART with PI [n = 17] vs 508 ± 281 in NRTI + NNRTI [n = 7], $P = .047$). No variation in *LPIN1* mRNA expression was observed between the remaining groups of antiviral in HIV-positive patients.

The *PPARγ* mRNA tended to be lower in HIV-positive compared with HIV-negative subjects and in HALS-positive compared with HALS-negative patients, respectively; but no significant differences were observed (Table 3B). The HIV-positive subjects had significantly higher *IL6* mRNA and a tendency to have higher levels of *TNFα* compared with HIV-negative controls.

3.2.3. Correlation and regression analysis

All HIV subjects (n = 37) were considered as a whole, controlling for sex and presence of lipodystrophy. *LPIN1* mRNA expression levels were positively correlated with S₁

($r = 0.496$, $P = .014$) and *PPARγ* mRNA expression ($r = 0.636$, $P < .001$) and were negatively correlated with BMI ($r = -0.371$, $P = .037$), *IL6* mRNA expression ($r = -0.458$, $P = .006$), and *TNFα* mRNA expression ($r = -0.508$, $P = .002$). In the multiple regression analysis, both *PPARγ* ($\beta = .527$, $P = .006$, CI 0.151-0.756) (Fig. 2A) and *TNFα* mRNA expressions ($\beta = -.467$, $P = .011$, 95% confidence interval [β] -0.710/-0.109) (Fig. 2B) were maintained as determinants of *LPIN1* mRNA levels, independently of sex and presence of lipodystrophy.

4. Discussion

In the present work, we have analyzed 2 different sets of subcutaneous adipose tissue biopsies: one from patients with increased adiposity and presence of type 2 diabetes mellitus and a second set from HIV-infected lipodystrophic patients. Our findings showed that *LPIN1* mRNA expression decreases with increasing adiposity with independence of the existence of type 2 diabetes mellitus. Likewise, HIV-associated lipodystrophy had no influence in *LPIN1* mRNA subcutaneous adipose tissue expression; but HAART-treated HIV-positive patients had higher *LPIN1* mRNA expression than HIV-negative controls.

We need to stress that the cohort for the obesity study is imbalanced in sex. However, after statistical analysis, no significant differences were found in *LPIN1* mRNA levels between sexes in nonmorbid subjects (data not shown). This prompted us to think that sex would not affect *LPIN1* expression. It will be very interesting to analyze *LPIN1*

Table 3B
 HALS study: quantification of gene expression levels (arbitrary units)

	HIV ⁻ (n = 21)	HIV ⁺ HALS ⁻ (n = 13)	HIV ⁺ HALS ⁺ (n = 24)
<i>LPIN1</i> *	1.36 ± 0.64	4.24 ± 2.68	3.82 ± 2.40
<i>PPARγ</i>	7.78 ± 4.32	6.32 ± 2.26	5.55 ± 2.39
<i>IL6</i> *	0.067 ± 0.120	0.116 ± 0.067	0.116 ± 0.049
<i>TNFα</i>	0.013 ± 0.010	0.014 ± 0.007	0.016 ± 0.008
<i>TNFR1</i> **	0.137 ± 0.072	0.273 ± 0.135	0.164 ± 0.121
<i>TNFR2</i> **	0.116 ± 0.098	0.270 ± 0.158	0.184 ± 0.126

* $P < .001$.

** $P < .01$.

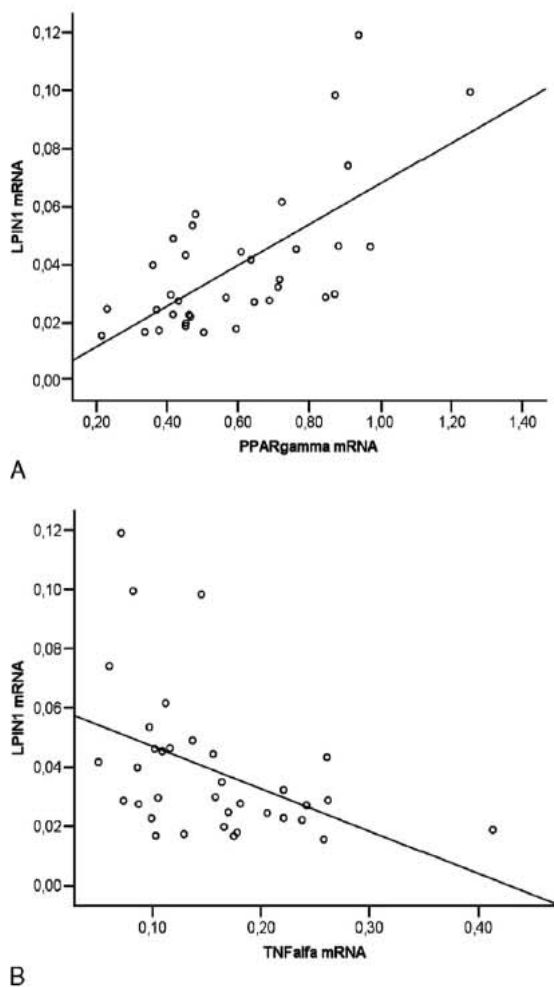


Fig. 2. Linear correlation between *LPINI* mRNA levels and *PPAR* γ mRNA (A) or *TNF* α mRNA (B) concentration in the HIV-positive cohort.

mRNA expression in a morbidly obese cohort with a balanced distribution of sexes.

Although we have not observed any correlation between adipose *LPINI* mRNA gene expression and plasma levels of adipokines, or cytokine mRNA levels in the obesity cohort, we would require further studies to clarify the causes of the down-regulation of *LPINI* mRNA levels. *LPINI* gene response to other factors that affect adipogenesis, such as glucocorticoids or β -adrenergics, needs to be elucidated.

We have observed a relationship between the adipogenic factor *PPAR* γ and *LPINI* gene expression in both sets of biopsies. In mouse models, *LPINI* has been found to be necessary for adipogenesis and to precede *PPAR* γ expression [2]. However, in the transgenic mice model that over-expresses *LPINI* mRNA specifically in adipose tissue, *PPAR* γ mRNA levels are not affected [5]. In mouse liver, *LPINI* expression is induced by *PPAR* γ coactivator 1 α , a

transcriptional coactivator for multiple metabolic pathways; and in turn, lipin activates the hepatic *PPAR* α /*PPAR* γ coactivator 1 α regulatory pathway by cooperating with it as a transcriptional activator of *PPAR* α [23]. All of the above mentioned data suggest that a common activator for *PPAR* γ and *LPINI* could exist in adipose tissue, and the positive association between both genes observed in our population may support this hypothesis.

The relation of *LPINI* with glucose homeostasis has been analyzed in transgenic mice [5] and in humans [12–15]. Two recent studies showed that *LPINI* mRNA levels were positively correlated with insulin sensitivity, determined by different approaches [12,13]. Although our patients with type 2 diabetes mellitus showed no differences in *LPINI* mRNA expression compared with the nondiabetic cohort, we observed a negative association with plasma insulin levels in the whole group. In addition, insulin sensitivity measured by the frequently sampled intravenous glucose tolerance test in HIV-positive patients was positively associated with *LPINI* adipose tissue expression. The study design does not permit the establishment of causality in this association; however, it has been postulated that *LPINI* could act as a regulator of the phosphatidate acid cellular levels [7] that participate in several intracellular mechanisms, including glucose homeostasis [10,11,24]. Some PIs have clearly been shown to induce insulin resistance in vivo [25,26]. In our study, HIV-positive patients who received PI tended to have lower insulin sensitivity than patients receiving HAART without PI, although there were no significant differences (data not shown). In addition, HALS-positive patients who received PI-containing HAART expressed significantly lower levels of *LPINI* mRNA compared with patients having HAART without PI agents. All the above findings may help us to speculate as to a possible role of *LPINI* as a modulator of insulin resistance induced by PI treatments.

In HAART-treated HIV-positive patients, we observed an increase in *LPINI* adipose expression regardless of the development of lipodystrophy. It is not possible to attribute this finding to the HIV infection or to the HAART therapy because the cross-sectional design of the study and the absence of a nontreated HIV-positive (naive) control group do not allow us to distinguish between potential effects of HIV or its treatment. Similar results have recently been published concerning HIV⁺ HALS⁻ HAART-treated patients showing an increase in *LPINI* expression with respect to healthy subjects, with no satisfactory explanation for this finding [15]. In addition, in the said work, the authors also analyzed separately the expression of both *LPINI* isoforms; and they found similar results: higher expression of both *LPINI* α and β isoforms in the HIV⁺ HALS⁻ HAART-treated patients. Alterations in lipogenesis and in adipocyte differentiation in HIV-positive patients have been hypothesized as an explanation for this *LPINI* increase. However the absence of differences in *PPAR* γ expression between HIV-positive (both HALS⁺ and HALS⁻) and HIV-negative subjects would argue against this hypothesis.

When we analyzed the *LPIN1* expression according to proinflammatory cytokines expressed in adipose tissue, we observed an inverse correlation in all studied populations (with *TNFR2* mRNA in obesity and type 2 diabetes mellitus and *TNF α* and *IL6* in HAART-treated HIV patients, respectively).

Elevated mRNA expressions of *TNF α* and *IL6* have been described in adipose tissue of morbidly obese patients and in HIV-positive patients [27–31]. In our population, a clear increase in subcutaneous adipose tissue of cytokine expression was observed in obese and HIV-positive populations. However, after controlling for several confounding factors, only in the HIV cohort was this negative relationship maintained with *TNF α* gene expression. Despite the increased expression level of *LPIN1* observed in HIV-positive patients, the inverse correlation with proinflammatory cytokines was maintained. These findings lead us to think that in HAART-treated HIV patients, there is something different regulating *LPIN1* expression than in other insulin-resistant conditions. It remains to be determined if lipin protein levels differ between control and HIV-infected populations because the present study was conducted only by examining mRNA levels.

The molecular function of this protein remains to be characterized, but it looks promising because all published data to date point to *LPIN1* participation in adipocyte differentiation, lipid metabolism, insulin signaling, and regulation of phosphatidate acid cellular levels, a signal lipid involved in several important cell functions. Further investigations need to be carried out to confirm these possible functions.

In summary, *LPIN1* mRNA expression levels in human subcutaneous adipose tissue are reduced in obesity, do not change in type 2 diabetes mellitus, and are increased in HAART-treated HIV-positive patients. In addition, *LPIN1* mRNA levels are positively correlated with insulin sensitivity in all the subjects analyzed here. Moreover, an inverse correlation with proinflammatory cytokines is observed. We showed that variation in *LPIN1* expression in HIV-positive patients is not influenced by the presence of lipodystrophy despite the fact that we cannot rule out an effect due to the antiretroviral treatment or to a response to HIV infection.

Acknowledgment

This study was supported by the following grants: Marató TV3 (02/1910), FIS 02/1280, FIS 04/0377, FIS 05/1994, FIS 05/1591, FIPSE 36610/06, and REDIMET (RD06/0015/0011).

Appendix A

The members of the Adipocyte Differentiation Study Group and coauthors of the paper are as follows: Francesc Vidal, Cristina Gutiérrez (University Hospital of Tarragona

Joan XXIII, “Pere Virgili” Institute, Tarragona, Spain), Enric Caubet (Surgery service, Hospital “St. Pau i Sta. Tecla,” Tarragona, Spain), Carles Masdevall, and Nuria Vilarrasa (University Hospital of Bellvitge, Barcelona, Spain).

References

- [1] Reitman ML. The fat and thin of lipin. *Cell Metab* 2005;1:5–6.
- [2] Phan J, Peterfy M, Reue K. Lipin expression preceding peroxisome proliferator-activated receptor- γ is critical for adipogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 2004;279:29558–64.
- [3] Peterfy M, Phan J, Xu P, Reue K. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet* 2001;27:121–4.
- [4] Reue K, Xu P, Wang XP, Slavin BG. Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, and increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (fld) gene. *J Lipid Res* 2000;41:1067–76.
- [5] Phan J, Reue K. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab* 2005;1:73–83.
- [6] Huffman TA, Mothe-Satney I, Lawrence Jr JC. Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:1047–52.
- [7] Han GS, Wu WI, Carman GM. The *Saccharomyces cerevisiae* lipin homolog is a Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J Biol Chem* 2006;281:9210–8.
- [8] Hamis TE, Huffman TA, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Kumar A, et al. Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1. *J Biol Chem* 2007;282:277–86.
- [9] Donkor J, Sarhanmetoglu M, Dewald J, Brindley DN, Reue K. Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J Biol Chem* 2007;282:3450–7.
- [10] Ruvinsky I, Meyuhos O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci* 2006;31:342–8.
- [11] Fang Y, Park IH, Wu AL, Du G, Huang P, Frohman MA, et al. PLD1 regulates mTOR signaling and mediates Cdc42 activation of S6K1. *Curr Biol* 2003;13:2037–44.
- [12] Suviolahti E, Reue K, Cantor RM, Phan J, Gentile M, Naukkarinen J, et al. Cross-species analyses implicate lipin 1 involvement in human glucose metabolism. *Hum Mol Genet* 2006;15:377–86.
- [13] Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Miles LM, Phanvanh B, Starks TN, et al. Lipin expression is attenuated in adipose tissue of insulin-resistant human subjects and increases with peroxisome proliferator-activated receptor γ activation. *Diabetes* 2006;55:2811–8.
- [14] van Harmelen V, Ryden M, Sjölin E, Hoffstedt J. A role of lipin in human obesity and insulin resistance: relation with adipocyte glucose transport and GLUT4 expression. *J Lipid Res* 2007;48:201–6.
- [15] Lindegaard B, Larsen LF, Hansen AB, Gerstoft J, Pedersen BK, Reue K. Adipose tissue lipin expression levels distinguish HIV patients with and without lipodystrophy. *Int J Obes* 2007;31:449–56.
- [16] Fernandez-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003;24:278–301.
- [17] Lihn AS, Richelsen B, Pedersen SB, Haugaard SB, Rathje GB, Madsbad S, et al. Increased expression of TNF α , IL-6, and IL-8 in HALS: implications for reduced adiponectin expression and plasma levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E1072–80.
- [18] World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO technical report series 894. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2000, p. 8–9.
- [19] Domingo P, Vidal F, Domingo JC, Veloso S, Sarnbeat MA, Torres F, et al. Tumour necrosis factor alpha in fat redistribution syndromes associated with combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected

- patients: potential role in subcutaneous adipocyte apoptosis. *Eur J Clin Invest* 2005;35:771-80.
- [20] 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;13:2251-60.
- [21] Fernandez-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamijana R, Gutierrez C, Vendrell J, et al. Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* 1998;47:1757-62.
- [22] Peterfy M, Phan J, Reue K. Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis. *J Biol Chem* 2005;280:32883-9.
- [23] Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, et al. Lpin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 α /PPAR α regulatory pathway. *Cell Metabolism* 2006;4:199-210.
- [24] Testerink C, Munnik T. Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci* 2005;10:368-75.
- [25] Behrens G, Dejam A, Schmidt H, Balks HJ, Brabant G, Komer T, et al. Impaired glucose tolerance, beta cell function and lipid metabolism in HIV patients under treatment with protease inhibitors. *AIDS* 1999;13:F63-F70.
- [26] Vigouroux C, Gharakhanian S, Salhi Y, Nguyen TH, Chevenne D, Capeau J, et al. Diabetes, insulin resistance and dyslipidaemia in lipodystrophic HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy (HAART). *Diabetes Metab* 1999;25:225-32.
- [27] Canello R, Clement K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG* 2006;113:1141-7.
- [28] Jones SP, Qazi N, Morelese J, Lebrecht D, Sutinen J, Yki-Jarvinen H, et al. Assessment of adipokine expression and mitochondrial toxicity in HIV patients with lipodystrophy on stavudine- and zidovudine-containing regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:565-72.
- [29] Jenwitheesuk E, Samudrala R. Virtual screening of HIV-1 protease inhibitors against human cytomegalovirus protease using docking and molecular dynamics. *AIDS* 2005;19:529-33.
- [30] Jan V, Cervera P, Maachi M, Baudrimont M, Kim M, Vidal H, et al. Altered fat differentiation and adipocytokine expression are inter-related and linked to morphological changes and insulin resistance in HIV-1-infected lipodystrophic patients. *Antivir Ther* 2004;9:555-64.
- [31] Kannisto K, Sutinen J, Korsheninnikova E, Fisher RM, Ehrenborg E, Gertow K, et al. Expression of adipogenic transcription factors, peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1, IL-6 and CD45 in subcutaneous adipose tissue in lipodystrophy associated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2003;17:1753-62.

ESTUDI 2

RESEARCH LETTER

The IL-6 system in HIV-1-infection and in HAART-related fat redistribution syndromes

Maria Saumoy^a, Miguel López-Dupla^a, Sergi Veloso^a, Carlos Alonso-Villaverde^b, Pere Domingo^c, Montserrat Broch^{a,d}, Mercé Miranda^{a,e}, Blai Coll^b, Amadeu Saurí^a, Joan Vendrell^{a,e}, Cristóbal Richart^{a,d} i Francesc Vidal^a.

(a) Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona.

(b) Hospital Universitari de Sant Joan, Reus

(c) Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona

(d) CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutrición (CB 06/03)

(e) CIBER Diabetes (CB 07/08/0012), Instituto de Salud Carlos III, Spain.

AIDS 2008; 22:893-896

Factor d'impacte: 5.46

Research Letters

AIDS 2008, 22:893–903

The IL-6 system in HIV-1-infection and in HAART-related fat redistribution syndromes

Maria Saumoy^a, Miguel López-Dupla^a, Sergi Veloso^a, Carlos Alonso-Villaverde^b, Pere Domingo^c, Montserrat Broch^{a,d}, Merce Miranda^{a,e}, Blai Coll^b, Amadeu Saurí^a, Joan Vendrell^{a,e}, Cristóbal Richart^{a,d} and Francesc Vidal^a

We determined the *IL-6 -174 G>C* single nucleotide polymorphism, IL-6 mRNA expression in subcutaneous adipose tissue (SAT) and IL-6 plasma levels in HIV-1-infected patients with and without lipodystrophy and uninfected controls. HIV-1-infected patients had a greater prevalence of the *IL-6 -174 C/C* genotype and the C allele, higher SAT IL-6 mRNA expression and plasma IL-6 levels than controls. The *IL-6 -174 G>C* genotype distribution and allele frequencies, SAT IL-6 mRNA expression and IL-6 plasma levels were non-significantly different between HIV-1-infected patients with and without lipodystrophy.

IL-6 is a multifunctional cytokine that acts as an immune, inflammatory and metabolic mediator. Given these properties, IL-6 is thought to be involved in several HIV-1-related events although data are inconsistent [1–11]. We undertook a cross-sectional study in a cohort of Caucasian Spanish HIV-1-infected patients treated with combination antiretroviral therapy (cART) with and without fat redistribution syndromes (FRS) and in an uninfected control group. Our objectives were to assess the influence of the *IL-6 -174G>C* single nucleotide polymorphism (SNP) on the risk of HIV-1 infection and on the risk of the development of FRS, and whether perturbations in subcutaneous adipose tissue (SAT) IL-6 messenger RNA expression and in IL-6 plasma levels exist in HIV-1-infected patients with and without FRS.

This was a multicentre case–control study. The study cohort consisted of 414 uninfected controls and 299 adult HIV-1-infected patients. These latter were recruited within a cohort of 1700 HIV-1-infected individuals who had been receiving stable cART for at least one year. We recruited all patients with moderate or severe FRS, which was assessed clinically [7,12,13] ($n = 143$), and a randomly selected group of patients without FRS ($n = 156$). Both groups were comparable by age, sex, and length of exposure to cART. Patients with HIV-1-associated cachexia, active opportunistic infections, current inflammatory diseases or conditions, the use of drugs with known metabolic effects or plasma C reactive protein

greater than 1 mg/dl were excluded. All participants were native white Spaniards and provided informed consent. The project was approved by local ethical committees. The *IL-6 -174G>C* genotype was assessed by restriction fragment-length polymorphism as previously described by our group [14]. IL-6 mRNA quantification in adipose tissue was analysed in 21 uninfected controls, 25 HIV-1-infected patients with FRS and 13 HIV-1-infected patients without FRS by real-time polymerase chain reaction and expressed relative to cyclophilin A and β -actin as previously described [15]. Plasma IL-6 levels were measured using the commercial kit Human IL6 Quantikine HS High Sensitivity (R&D Systems, Lille, France). The Student's *t*-test and one-way analysis of variance with the posthoc Bonferroni test were used to compare continuous variables. The Mann–Whitney U test was used to compare non-parametric variables. Qualitative variables were analysed using the χ^2 test. Hardy–Weinberg equilibrium was assessed by the χ^2 goodness-of-fit test. Two-way analysis of variance, Pearson correlation analyses, Spearman's rank correlation test, and forward stepwise logistic regression analysis with the model adequately fitted by Hosmer and Lemeshow's goodness of fit test were used when needed. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

HIV-1-infected patients and uninfected controls were comparable by age (42 ± 8.8 versus 41 ± 14.6 ; $P = 0.97$) and sex (64.9% versus 60.1% male; $P = 0.21$). Compared with patients without FRS, the group with FRS had significant perturbations in their anthropometric and metabolic parameters (full data not shown, available on request). Table 1 shows that the *IL-6 -174 C/C* genotype and the C allele were overrepresented in HIV-1-infected subjects with respect to uninfected controls ($P = 0.05$ and $P = 0.007$, respectively). No significant differences were observed in the genotype and allele distribution when patients with and without FRS were compared. Also, the *IL-6* genotype did not modulate the rapidity of the onset of FRS ($P = \text{NS}$). IL-6 mRNA expression in SAT was non-significantly different in HIV-1-infected patients with and without FRS, whereas both subsets had significantly greater IL-6 mRNA than uninfected controls ($P < 0.001$). HIV-1-infected patients had significantly greater plasma IL-6 levels than uninfected controls (2.6 ± 3 versus 1.4 ± 1.4 pg/ml, $P < 0.001$) but among infected patients plasma IL-6 levels did not differ between patients with and without FRS ($P = 1$). Plasma IL-6 levels in patients who had or had not received thymidine analogues were non-significantly different, irrespective of the presence or absence of FRS ($P = 0.8$). We performed several comparisons to assess the relationship between each individual

Table 1. Genotype distribution and allele frequencies of *IL-6* -174 G>C single nucleotide polymorphism in uninfected controls and HIV-1-infected subjects categorized according the presence or absence of fat redistribution syndromes.

Genotype and allele frequencies	All			HIV-1 infected		
	UC (n=414)	HIV-1-infected (n=299)	P	Without FRS (n=156)	With FRS (n=143)	P
G/G	182 (47.3)	108 (39.6)	0.05	54 (39.1)	54 (40)	0.99
G/C	154 (40)	114 (42.5)		58 (42)	56 (41.5)	
C/C	49 (12.7)	51 (18.7)		26 (18.8)	25 (18.5)	
Allele C	252 (33)	218 (39)	0.007	110 (40)	105 (39)	0.82

FRS, Fat redistribution syndromes; UC, uninfected controls. Results are expressed as n (%). Genotype distribution and allele frequencies in the uninfected controls and HIV-1-infected subjects were in accordance with the expected Hardy-Weinberg equilibrium. Genotype and allele numbers do not match with participants because DNA for *IL-6* genotyping was not available or could not be amplified in some individuals.

protease inhibitor (PI) that our patients received (indinavir, n=84; nelfinavir, n=46; saquinavir, n=42, ritonavir, n=41, lopinavir/ritonavir, n=8), several metabolic outcomes for each PI (FRS, hyperglycaemia, insulin-resistance, hypertriglyceridemia, high low-density lipoprotein cholesterol or low high-density lipoprotein cholesterol, all yes or no (see Domingo *et al.* [7], Carr *et al.* [12], Christeff *et al.* [13] and Ford *et al.* [16] for categorization criteria) and plasma *IL-6* levels. All comparisons gave non-significant differences (P=NS).

Our study provides some relevant insights into the role of *IL-6* in HIV-1 infection and in cART-related FRS. With respect to the pathogenesis of HIV-1 infection, we found that the *IL-6* -174G>C polymorphism may modulate the risk of infection. Our findings contrast with those of Price *et al.* [9], who found no differences in the *IL-6* -174G>C distribution between uninfected blood donors and different categories of HIV-1-infected patients, although the number of HIV-1-infected patients assessed was low. *IL-6* plays a pivotal role in the initial response to infection because it influences both innate and acquired immunity [17]. As both types of immune responses are involved in the first steps of HIV-1 infection, it is biologically plausible to investigate the modulator effect of *IL-6* genetic variants on the vulnerability to HIV-1 infection. Our data suggest that the *IL-6* -174 G>C SNP could modulate the risk of HIV-1 infection. The fact that our control group comprised individuals with no known risk factors for HIV-1 infection dictates caution when interpreting our findings, the best control group would have been made up of exposed uninfected individuals. We have also shown that there is an overproduction of *IL-6* in infected patients under cART compared with uninfected controls. This finding has been recognized for many years [18] and may be related to the inflammatory phenomenon that accompanies HIV-1 infection and is thought to be responsible for the polyclonal hypergammaglobulinemia observed in these patients [19].

An additional aim of our study was to extend our present knowledge regarding the pathogenic mechanisms involved in FRS. Although the pathogenesis of FRS is

not fully understood [20], reports elsewhere have elegantly shown an association between nucleoside reverse transcriptase inhibitor thymidine analogues, mitochondrial toxicity and lipotrophy [21,22]. Note that in our cohort the only independent predictor of the development of FRS was the length of time of stavudine exposure [1-24 months, odds ratio (OR) 8, 95% confidence interval (CI) 1.1-56, P=0.036; 25-48 months, OR 10, 95% CI 1.6-64, P=0.01; > 48 months, OR 33, 95% CI 4.3-251, P=0.001]. A relationship between lipotrophy, mitochondrial damage and *IL-6* has been investigated [8]. Data from our genetic analysis, however, suggest that the *IL-6* -174G>C SNP is not related to the development of FRS and its associated metabolic derangements in HIV-1-infected patients on cART. Also, the systemic activation of the *IL-6* system, measured as plasma *IL-6* levels, which we have detected in our HIV-1-infected cohort is unrelated to the presence or absence of FRS or several metabolic outcomes and to the individual PI drugs to which our patients were exposed.

We recognize some limitations in our study. The cross-sectional nature of our design provides associations, not causality. Moreover, the clinical definition of FRS does not allow us to discount the possibility that some FRS-negative patients could have minor subclinical changes not detectable on a clinical basis, thus some patients in the FRS-negative subset could in fact be false negatives. We believe, however, that this is unlikely in our study because our cohort was made up of extreme FRS phenotypes and comprised only overt FRS versus non-FRS patients, with slight/mild FRS (potential false negatives) being omitted.

In summary, when taken together, our data suggest that the *IL-6* system may be involved in HIV-1 pathogenesis but its role in cART-related FRS seems to be low if any.

Acknowledgements

John Bates kindly improved the English text.

The members of the HIV-1 Lipodystrophy Study Group and co-authors of this paper are: Maria Saumoy, Miguel López-Dupla, Montserrat Broch, Sergi Veloso, Matilde R. Chacón, Merce Miranda, Carmen Aguilar, Eva González, Carles Olona, Joan-Josep Sirvent, Montserrat Olona, Amadeu Saurí, Joan Vendrell, Cristóbal Richart, Consuelo Viladés, Joaquim Peraire, Francesc Vidal (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII and Universitat Rovira i Virgili); Carlos Alonso-Villaverde, Blai Coll, Sandra Parra, Jordi Joven, Lluís Masana (Hospital Universitari de Sant Joan de Reus and Universitat Rovira i Virgili); Pere Domingo, Maria Antònia Sambeat, Àngels Fontanet, Mar Gutiérrez, Gràcia Mateo (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona).

^aHospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; ^bHospital Universitari de Sant Joan, Reus, Spain; ^cHospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ^dCIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutrición (CB 06/03), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; and ^eCIBER Diabetes (CB 07/08/0012), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Sponsorship: This work has been partly financed by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 02/1282, 04/1752, 04/0377, 05/1591, 05/1944 and 07/0976); Fundació La Marató de TV3 (02/1830 and 02/1910), Fundació para la Investigación y Prevención del Sida en España (FIPSE 06/36572 and 06/30610); SAF2005-0413; Red de Investigación en Sida (RD06/006/0022) and REDIMET (RD06/0015/0011), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo. M.S. and B.C. are the recipients of a research career award from the Instituto de Salud Carlos III, Spain. M.R.C. is supported by a fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria CP06/00119.

Conflicts of interest: None.

Received: 29 June 2007; *revised:* 13 November 2007; *accepted:* 27 November 2007.

References

1. Kannisto K, Sutinen J, Korshennikova E, Fisher RM, Ehrenborg E, Gertow K, et al. Expression of adipogenic transcription factors, peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1, IL-6 and CD45 in subcutaneous adipose tissue in lipodystrophy associated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2003; 17:1753–1762.
2. Lihn AS, Richelsen B, Pedersen SB, Haugaard SB, Rathje GS, Madsbad S, et al. Increased expression of TNF- α , IL-6, and IL-8 in HALS: implications for reduced adiponectin expression and plasma levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E1072–E1080.
3. Sutinen J, Kannisto K, Korshennikova E, Fisher RM, Ehrenborg E, Nyman T, et al. Effects of rosiglitazone on gene expression in subcutaneous adipose tissue in highly active antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286:E941–E949.
4. Johnson JA, Albu JB, Engelson ES, Fried SK, Inada Y, Ionescu G, et al. Increased systemic and adipose tissue cytokines in patients with HIV-associated lipodystrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286:E261–E271.
5. Jan V, Cervera P, Maachi M, Baudrimont M, Kim M, Vidal H, et al. Altered fat differentiation and adipocytokine expression are inter-related and linked to morphological changes and insulin resistance in HIV-1-infected lipodystrophic patients. *Antivir Ther* 2004; 9:555–564.
6. He G, Andersen O, Haugaard SB, Lihn AS, Pedersen SB, Madsbad S, et al. Plasminogen activator inhibitor type I (PAI-1) in plasma and adipose tissue in HIV-associated lipodystrophy syndrome. Implications of adipokines. *Eur J Clin Invest* 2005; 35:583–590.
7. Domingo P, Vidal F, Domingo JC, Veloso S, Sambeat MA, Torres F, et al. Tumor necrosis factor alpha in fat redistribution syndromes associated with combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients: potential role in subcutaneous adipocyte apoptosis. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 771–780.
8. Jones SP, Qazi N, Morelese J, Lebrecht D, Sutinen J, Yki-Jarvinen H, et al. Assessment of adipokine expression and mitochondrial toxicity in HIV patients with lipodystrophy on stavudine- and zidovudine-containing regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40:565–572.
9. Price P, Morahan G, Huang D, Stone E, Cheong KYM, Castley A, et al. Polymorphism in cytokine genes define subpopulations of HIV-1 patients who experienced immune restoration diseases. *AIDS* 2002; 16:2043–2047.
10. Foster CB, Lehrbecher T, Samuels S, Stein S, Mol F, Metcalf JA, et al. An IL-6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus. *Blood* 2000; 96:2562–2567.
11. Fernandez S, Rosenow AA, James IR, Roberts SG, Nolan RC, French MA, et al. Recovery of CD4⁺ T cells in HIV patients with a stable virologic response to antiretroviral therapy is associated with polymorphisms of interleukin-6 and central major histocompatibility complex genes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41:1–5.
12. 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.
13. Christeff N, Melchior JC, de Truchis P, Perronne C, Nuñez 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; 13:2251–2260.
14. Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1334–1339.
15. Ceperuelo-Mallafre V, Miranda M, Chacón MR, Vilarrasa N, Megia A, Gutiérrez C, et al. Adipose tissue expression of the glycerol channel aquaporin-7 gene is altered in severe obesity but not in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:3640–3645.
16. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National health and Nutrition Examination. *JAMA* 2002; 287:356–359.
17. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthr Res Ther* 2006; 8 (Suppl 2):1–6.
18. Breen EC, Rezai AR, Nakajima K, Beall GN, Mitsuyasu RT, Hirano T, et al. Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production. *J Immunol* 1990; 144: 480–484.
19. Rautonen J, Rautonen N, Martin NL, Philip R, Wara DW. Serum interleukin-6 concentrations are elevated and associated with elevated tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G and A concentration in children with HIV infection. *AIDS* 1991; 5:1319–1325.
20. Mallon PW. Pathogenesis of lipodystrophy and lipid abnormalities in patients taking antiretroviral therapy. *AIDS Rev* 2007; 9:3–15.

896 AIDS 2008, Vol 22 No 7

21. Carr A, Miller J, Law M, Cooper DA. A syndrome of lipodatrophy, lactic acidemia and liver dysfunction associated with HIV nucleoside analogue therapy: contribution to protease inhibitor-related lipodystrophy syndrome. *AIDS* 2000; 14:F25-F32.
22. Grinspoon S, Carr A. Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N Engl J Med* 2005; 352:48-62.

ESTUDI 3

ORIGINAL ARTICLE

***PPAR γ Pro12Ala* polymorphism in HIV-1-infected patients with HAART-related lipodystrophy**

Maria Saumoy¹, Sergi Veloso^{1,2,3}, Carlos Alonso-Villaverde^{2,3,4}, Pere Domingo^{5,6}, Matilde R Chacón^{1,7}, Mercé Miranda^{1,7}, Gerard Aragonès⁴, M^a Mar Gutiérrez⁵, Consuelo Viladés^{1,2,3}, Joaquim Peraire^{1,2,3}, Joan-Josep Sirvent^{1,2,3}, Miguel López-Dupla^{1,2,3}, Carmen Aguilar^{3,8}, Cristóbal Richart^{1,2,3,8}, Francesc Vidal^{1,2,3} for the HIV Lipodystrophy Study Group.

¹ Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain

² IISPV, Tarragona, Spain

³ Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

⁴ Hospital Universitari de Sant Joan, Reus, Spain

⁵ Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

⁶ Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

⁷ CIBERdem, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁸ CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Current HIV Research 2009; 7: 533-540

Factor d'impacte 2.6

PPAR γ Pro12Ala Polymorphism in HIV-1-Infected Patients with HAART-Related Lipodystrophy

Maria Saumoy^{1,†}, Sergi Veloso^{1,2,3}, Carlos Alonso-Villaverde^{2,3,4}, Pere Domingo^{5,6}, Matilde R. Chacón^{1,7}, Merce Miranda^{1,7}, Gerard Aragonès⁴, M^a Mar Gutiérrez⁵, Consuelo Viladés^{1,2,3}, Joaquim Peraire^{1,2,3}, Joan-Josep Sirvent^{1,2,3}, Miguel López-Dupla^{1,2,3}, Carmen Aguilar^{3,8}, Cristóbal Richart^{1,2,3,8}, Francesc Vidal^{*1,2,3} for the HIV Lipodystrophy Study Group[§]

¹Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain; ²IISPV, Tarragona, Spain; ³Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; ⁴Hospital Universitari de Sant Joan, Reus, Spain; ⁵Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ⁶Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁷CIBERdem, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁸CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Abstract: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is involved in obesity and in some components of the metabolic syndrome in unselected population. To determine whether PPAR γ genetic variants are associated with the risk of developing lipodystrophy and its associated metabolic disturbances in HIV-1-infected patients treated with HAART and to assess PPAR γ mRNA expression in subcutaneous adipose tissue (SAT). The study group comprised 278 patients infected with HIV-1 and treated with antiretroviral drugs (139 with lipodystrophy and 139 without) and 105 uninfected controls (UC). The PPAR γ Pro12Ala (C>G) single nucleotide polymorphism (SNP) was assessed using PCR-RFLPs on white cell DNA. PPAR γ mRNA expression in SAT was assessed in 38 patients (25 with lipodystrophy and 13 without) and in 21 UC by real-time PCR. Statistical analysis was based on Student's T tests, χ^2 tests, Spearman's correlations tests and logistic regression tests. PPAR γ Pro12Ala genotype distribution and allele frequencies were non-significantly different between both HIV-1-infected categories, lipodystrophy vs non-lipodystrophy ($p = 0.9$ and $p = 0.87$, respectively). Lipodystrophic patients harbouring the rare X/Ala genotype (Ala/Ala plus Pro/Ala) had significantly greater plasma total and LDL cholesterol levels compared with carriers of the common Pro/Pro genotype ($p = 0.029$ and $p = 0.016$, respectively) at univariate analyses. At multivariate analyses these associations were no longer significant. There was a near-significant decreased SAT PPAR γ mRNA expression in patients with lipodystrophy compared to UC ($p = 0.054$). PPAR γ Pro12Ala SNP has no effect on the risk of developing lipodystrophy in HIV-1-infected patients treated with HAART. PPAR γ mRNA SAT expression appears decreased in lipodystrophy.

Keywords: HIV, lipodystrophy, dyslipidemia, PPAR γ , polymorphism, pharmacogenetics.

INTRODUCTION

Highly active antiretroviral therapy (HAART) has markedly improved the prognosis of HIV-1-infected persons. Unfortunately, side effects are frequent and can compromise the success of therapy. Lipodystrophy is a long-term adverse effect characterized by loss of subcutaneous adipose tissue (lipoatrophy) in legs, arms and face and/or accumulation of adipose tissue (lipohypertrophy) in the intraabdominal space, the dorso-cervical region and the breasts. Metabolic disturbances such as dyslipidaemia and insulin resistance or hyperglycaemia accompany the lipodystrophy syndrome. Its pathogenesis is complex and not well understood [1], but *in vitro* and *ex vivo* studies have shown that perturbations in

adipocyte differentiation and adipocyte apoptosis do exist in lipoatrophic areas and both are currently considered to be major contributors to adipocyte cell loss [2, 3].

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are nuclear receptors that belong to the steroid receptor superfamily [4-6]. PPAR γ , a member of this family, is expressed mainly in adipose tissue and plays an important role in adipocyte differentiation both inducing the expression of adipocyte-specific genes and promoting the formation of mature lipid-laden adipocytes [7, 8]. Reports elsewhere have shown that HIV-1-infected patients with lipodystrophy had reduced PPAR γ mRNA expression in subcutaneous adipose tissue (SAT) compared with patients without lipodystrophy and uninfected persons [9-11]. *In vitro* studies have also shown a decreased PPAR γ expression in preadipocytes treated with different protease inhibitors (PI) [12-14]. Additionally, HIV-1 proteins such as Vpr and Nef can suppress PPAR γ activity [15, 16]. Adipocyte PPAR γ expression seems therefore to be influenced by both HIV proteins and antiretroviral drugs.

PPAR γ production is at least partially genetically determined. Several PPAR γ genetic variants have been identified, among which is the Pro12Ala polymorphism [17]. This missense mutation is located in exon 2 and changes

*Address correspondence to this author at the Infectious Diseases and HIV/AIDS Section, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Mallafre Guasch, 4. 43007 Tarragona, Spain; Tel: 0034977295833; Fax: 0034977224011; E-mail: francesc.vidal@iispv.cat

†Present Address: Department of Infectious Diseases, Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge, L'Hospitalet del Llobregat, Barcelona, Spain

§See appendix for group members

proline into alanine (C>G). It is relatively common in the Caucasian population, with an allelic frequency ranging between 2% and 23% in different ethnic groups [18, 19]. An *in vitro* study has shown that the *Ala* variant carries a reduced transcriptional and adipogenic activity, which could lead to lower adipose tissue mass accumulation [20]. Genetic association studies in the general population have related the *Pro12Ala* variant to a reduced risk for type 2 diabetes, greater insulin sensitivity and lower lipolysis, although the data are inconsistent [20-25]. Also, various rare loss-of-function mutations in the PPAR- γ gene can cause a form of familial partial lipodystrophy, associated insulin-resistance and dyslipidemia [26-29]. Since most of these features are found in HAART-related lipodystrophy, it appears biologically plausible to investigate whether PPAR γ genetic variants are involved in HIV-1-associated lipodystrophy and/or its associated metabolic derangements. We therefore undertook the present study with the aim of assessing the possible relationship between the PPAR γ *Pro12Ala* polymorphism and HAART-related lipodystrophy, dyslipidemia and insulin-resistance in a cohort of Spanish HIV-1-infected patients treated with HAART. We also assessed the PPAR γ mRNA expression in some patients with and without lipodystrophy and in an uninfected control group.

PARTICIPANTS AND METHODS

Design, Setting and Participants

This was a multicentre matched nested case control study within a longitudinal HIV-1 treatment cohort. We studied 383 adults: 278 HIV-1-infected patients and 105 uninfected controls (UC). Patients were recruited within a prospectively collected cohort of 1700 HIV-1-infected individuals who were receiving HAART, defined as the combination of 2 nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) plus either a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) or protease inhibitor(s) (PI). The patients were followed at the HIV outpatient clinic of the three participating hospitals. Inclusion criteria were age greater than 18 years, presence of HIV-1 infection, stable HAART regimen for at least 1 year and presence or absence of lipodystrophy according to a predefined criteria (see below). The sample size of each category of patients (lipodystrophy and non-lipodystrophy), assuming a prevalence of the variant *A* allele of 15% in patients with lipodystrophy and of 30% in patients without lipodystrophy (OR = 2), with a power of 80% and a risk alpha of 5%, was 130 patients per group. We recruited 139 patients who fulfilled the criteria of lipodystrophy and agreed to participate in the study as well as a randomly selected group of patients without lipodystrophy (n = 139) whose age (± 5 years), gender, and time of exposure to HAART (± 3 months) was comparable to that of patients with lipodystrophy. The control group was made of uninfected, mostly healthy persons comparable to the patients in age (± 5 years) and gender. The presence of cachexia, active opportunistic infections, current inflammatory diseases or conditions, consumption of drugs with known metabolic effects such as steroids and hormones, and plasma C reactive protein > 1 mg/dl were exclusion criteria for both patients and controls. All subjects were white Spaniards; immigrants and their descendants (including those from other European

countries) were excluded. All participants gave informed consent. The project was approved by the local ethical committees.

Methods

Assessment of FRS

All HIV-1-infected patients had a complete physical examination for assessment of the type of lipodystrophy (lipoatrophy or mixed, patients with pure lipohypertrophy [n = 4] were not included) and its degree (slight, moderate or severe). Waist and hip diameter, height, weight and body mass index (BMI) were measured. The presence of lipodystrophy was defined by changes in the body fat composition important enough to be recognized both by the patient and the attending physician. Lipoatrophy was defined by the presence of one or more of the following criteria: loss of fat from the face, arms and legs, prominent veins in arms and legs and a thin bottom. Lipohypertrophy was defined by the presence of one or more of the following criteria: increase in abdominal perimeter, breast and/or neck fat deposition. We defined mixed lipodystrophy as being when at least one characteristic of lipoatrophy and one of lipohypertrophy were concomitantly present in one patient. Lipodystrophy was categorized according to the scale proposed by Carr *et al.* [30] as non-existent (0), slight (1), moderate (2) and severe (3). Doubtful cases were excluded. This categorization was evaluated in the face, arms, legs, buttocks, abdomen, neck and breasts. The sum of the values corresponding to each corporal zone indicated the degree of lipodystrophy: none (0), slight (1-6), moderate (7-12) and severe (13-18) [30-32]. In this study only moderate and severe cases were included in order to avoid superposition between groups. To assess the distribution of subcutaneous adipose tissue (SAT) and visceral adipose tissue (VAT), a single-slice computed tomography (CT) scan at the level of L4 was available from a subset of 38 HIV-1-infected patients (25 with lipodystrophy and 13 without). The volume of adipose tissue was measured in cm³.

Blood, DNA and Plasma Samples

After 12 hours fasting, blood samples with ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) were obtained from an antecubital vein. Five mL of whole blood was used to determine CD4⁺ T-cell count, and 500 μ l was used for DNA isolation using a MagNa Pure LC Instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Plasma and serum were obtained by centrifugation at 3500 g for 15' at 4°C and were stored at -80°C until use.

Laboratory Methods

Blood chemistry: Serum glucose was measured using the glucose oxidase method with a Hitachi autoanalyser. Lipid profile (serum total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides) was measured using the usual enzymatic methods. LDL-cholesterol was calculated by the Friedewald's formula. Serum insulin was measured in duplicate by monoclonal immunoradiometric assay (IRMA, Medgenix Diagnostics, Fleunes, Belgium). The lowest limit of detection was 4.6 μ U/ml and the intraassay and interassay coefficients of variation were 5.2% and 6.9%, respectively. Hyperglycaemia was defined as a blood

PPAR γ SNP in HIV-1-Infected Patients

Current HIV Research, 2009, Vol. 7, No. 5 3

glucose level of ≥ 6.1 mmol/L, hypertriglyceridemia was defined as a triglyceride level of ≥ 2.2 mmol/L, hypercholesterolemia was defined as a total cholesterol level of ≥ 5.2 mmol/L, a low HDL cholesterol was defined as a level of ≤ 0.9 mmol/L and a high LDL cholesterol was defined as a level of ≥ 3.4 mmol/L [33]. Hyperinsulinemia was considered when insulin levels were ≥ 18 μ U/mL [34]. Insulin resistance was calculated according to the homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-r) method from fasting glucose and insulin concentrations, according to the following formula: insulin (μ IU/ml) x glucose (mmol/L)/22.5.

HIV-1 infection: This was diagnosed using a positive enzymoimmunoanalysis and confirmed by a positive Western-Blot test.

HCV infection: This was assessed by detection of a positive anti-HCV antibody test in serum, through indirect qualitative immunoassay (sandwich twice washed) (Advia Centaur, Bayer Health Care, Tarrytown, NY)

Plasma HIV-1 viral load: This was determined by the HIV Cobas Ampliprep CAP-CTMHIV-1 using the COBAS AMPLICOR system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Assessment of blood CD4+ T-cell lymphocytes: Samples were analyzed in a flow cytometer FAC Scan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA). Data acquired were analyzed using the Multiset program.

PPAR γ Pro12Ala polymorphism: This polymorphism, located in the peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma 2$ (PPAR $\gamma 2$) gene, consists of a C>G transversion that changes Pro to Ala at the protein level. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. The Pro12Ala SNP was studied by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis. The primers used in PCR were: primer forward: 5' GCC AAT TCA AGC CCA GTC 3', and primer reverse: 5' GAT ATG TTT GCA GAC AGT GTA TCA GTG AAG GAA TCG CTT TCC G 3' and were analysed with BstU I restriction endonuclease (New England Biolabs Inc, Beverly, MA, USA). A fragment of 270 bp was amplified in a final volume of 25 μ l, with 3mM of MgCl₂, 0.2 mM of dNTPs, 0.4 μ M of each primer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and 2 units of Taq polymerase (Ecogen, Barcelona, Spain). DNA was amplified during 35 cycles: 95°C 1 minute, 60°C 30 seconds and 72°C 1 minute. PCR products were digested with BstU I at 60°C O/N, electrophoresed on 2, 5% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide which revealed a fragment of 270 bp for C allele (or Pro12) and two fragment of 227 and 43 bp for G allele (or 12Ala).

PPAR γ mRNA quantification in adipose tissue: Samples from subcutaneous adipose tissue (SAT) were obtained from subcutaneous abdominal depots by a small surgical biopsy, under local anaesthesia with mepivacaine. Twenty-five HIV-1-infected patients with lipodystrophy, 13 HIV-1-infected patients without lipodystrophy and 21 UC, the latter being comparable in age, gender and body mass index (BMI) with HIV-1-infected subjects, were biopsied. Subcutaneous biopsies were immediately frozen in liquid nitrogen and

stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA from 500 mg of adipose tissue biopsy was extracted using and RNeasy[®] Lipid Midi Kit (Qiagen Science, Valencia, CA, USA). Two μ g of RNA was reverse transcribed (RT) using the Promega Reverse Transcription system (Promega Corporation Madison, WI, USA). cDNA quantification was done by LightCycler technology (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) with DNA LC-FastStart DNA Master SYBR green I. The pair of primers used were 5' ctatggagttcatgcttgg3' and 5'gtactgacattatt3'. The housekeeping genes used to normalise gene expression were: β -actin 5'ggacttcgagcaagagatgg3' and 5'agcactgtgtggcgtacag3' and, cyclophilin A 5'caaatgctggacccaacac3' and 5'gcctccacaatattatgccttt3'. For each sample the derived concentration was calculated from an external standard curve prepared with the specific PCR gene amplicon cloned in the pCRII-TOPO (TOPO TA cloning kit; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) by the instrument software (LightCycler, Roche Diagnostics), using the crossing point value and normalised with the expression of the housekeeping genes (weighted mean of both housekeepings).

Statistical Analysis

Qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies. Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Prior to statistical analyses, normality distribution and homogeneity of the variances were tested. Student's T test was used to compare continuous variables between two groups. For variables not normally distributed, the Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney non parametric U-test were used. Qualitative variables, including genotype and allele frequencies were analysed using the Chi-square test or Fisher test when necessary. Because the number of individuals homozygous for the Ala variant was small, they were pooled with heterozygotes for analyses (X/Ala genotype = Ala/Ala plus Pro/Ala). The Hardy-Weinberg equilibrium was assessed using the χ^2 goodness-of-fit test. Multivariate analyses were performed by the logistic regression test. The relationship between PPAR γ mRNA expression and continuous variables was assessed by Spearman's rank correlation test. A P value of ≤ 0.05 was considered significant. All analyses were performed using the SPSSPC statistical package (V. 11.01 for Windows; Chicago, IL).

RESULTS

Characteristics of the Study Population

Age (41.8 \pm 8.5 in HIV-1-infected subjects vs 40.5 \pm 13.1 in UC; p = 0.37) and gender (64.6% vs 63.7% male; p = 0, 87) were comparable between UC and HIV-1-infected subjects. Demographic and clinical characteristics of the HIV-1-infected group, categorized according to the presence or absence of lipodystrophy, are described in Table 1. Male gender was predominant in all groups. Mixed lipodystrophy was the predominant form (75.2%). BMI and waist/hip circumference ratio were significantly higher in patients with lipodystrophy compared to those without (p = 0.013 and p<0.001 respectively). Patients with lipodystrophy had a better CD4+ T-cell recovery (p = 0.008). In relation to antiretroviral drugs, both groups had a similar duration of

Table 1. Demographic, Clinical and Laboratory Characteristics of the HIV-1-Infected Study Group

Variable	Without Lipodystrophy (n = 139)	With Lipodystrophy (n = 139)	p Value
Age (y)	40.4 ± 13.6	42.6 ± 7.6	0.385
Male (%)	69.1	60.4	0.121
Body mass index, Kg	22.9 ± 3.0	23.6 ± 2.7	0.013
Body mass index > 25 (%)	20.7	30.2	0.086
Waist/hip circumference ratio	0.89 ± 0.1	0.94 ± 0.1	<0.001
AIDS (A3, B3, C category) (%)	43/118 (36.4)	58/116 (50)	0.036
HCV infection (%)	65/118 (55.1)	51/114(44.7)	0.115
Duration of HIV infection, years	8.9 ± 4.7	9.7 ±4.2	0.122
CD4+ T-cell count (cells/mL)			
Nadir	332.2 ± 272.6	275.2 ± 240.4	0.071
CD4+ T-cell recovery (current-nadir CD4)	184.8 ± 313.2	312.1 ± 240.4	0.008
HIV-RNA plasma			
Pre HAART, log copies/mL	4.6 ± 1	4.5 ± 1.1	0.614
Current plasma viral load <200 (%)	104/138 (75.4)	110/135 (81.5)	0.219
Antiretroviral therapy, months #			
Duration of HAART	61.2 ± 30.8	53.9 ± 23.4	0.203
Exposure to NRTI before HAART, yes (%)	15/41 (36.6)	37/68 (54.4)	0.071
Cumulative time on PI	30.4 ± 28	34.7 ± 24.5	0.073
PI consumption, yes (%)	104/139 (74.8)	113/134 (84.3)	0.052
Cumulative time on NRTI	98.6 ± 61.1	122.6 ± 50.5	<0.001
NRTI consumption, yes (%)	130/139 (93.5)	135/135 (100%)	0.003
Cumulative time on d4T	14.5 ± 20.6	35.2 ± 21.9	<0.001
Cumulative time on NNRTI	13.3 ± 16.9	17.1 ± 16.9	0.034
NNRTI consumption, yes (%)	91/138 (65.9)	97/135 (71.9)	0.292
Glucose/Insulin			
Glucose (mmol/L)	5.2±0.7	5.5±1.4	0.211
Hyperglycaemia ≥ 6.1, (%)	16/138 (11.6)	25/135 (18.5)	0.109
Insulin (µU/mL)	8.9 ± 10.1	14.4 ± 17.7	<0.001
Insulin ≥ 18, n (%)	14/132 (10.6)	38/134 (28.4)	<0.001
HOMA-IR	2.1 ± 2.7	3.9 ± 5.1	<0.001
Lipids (mmol/L)			
Triglyceride	1.8 ± 1.4	3 ± 2.4	<0.001
Triglyceride ≥ 2.2, n (%)	29/138 (21)	70/134 (52.2)	<0.001
Total cholesterol	4.9 ± 1.2	5.5 ± 1.4	<0.001
Colesterol ≥ 5.2, n (%)	54/138 (39.1)	75/135 (55.6)	0.007
LDL cholesterol	2.8 ± 1	3.3 ± 1.2	0.002
LDL ≥ 3.4, n (%)	31/134 (23.1)	46/111 (41.4)	0.002
HDL cholesterol	1.3 ± 0.6	1.1 ± 0.4	<0.001
HDL ≤ 0.9, n (%)	25/138 (18.1)	49/135 (36.3)	0.001

Quantitative variables are expressed as mean ± standard deviation. Qualitative variables are expressed as percentage.

Use of some other antiretroviral drugs (ddI, 3TC, ABC, TFV, EFV, NVP, SQV, IDV, RTV, NFV, APV, LPV, ATV) was non-significantly different between groups.

HAART, but patients with lipodystrophy more frequently consumed NRTI and PI. In addition, this group had a more

prolonged exposure to NRTI as a whole and, particularly, to d4T (p<0.001 and p<0.001, respectively) than patients

PPAR γ SNP in HIV-1-Infected Patients

Current HIV Research, 2009, Vol. 7, No. 5 5

without lipodystrophy. With respect to metabolic parameters, Table 1 shows that metabolic disturbances were, in general, more prevalent and deeper in patients with lipodystrophy compared to those without.

PPAR γ Pro12Ala SNP

Table 2 shows the genotype distribution and allele frequencies for *PPAR γ* Pro12Ala polymorphism. Genotype distribution and allele frequencies in the UC and HIV-1-infected subjects were in accordance with the expected Hardy-Weinberg equilibrium. We observed no differences between HIV-1-infected subjects with and without lipodystrophy ($p = 0.9$ and $p = 0.87$ for genotypewise and allelwise comparisons, respectively). Using lipodystrophy as outcome, we found no association between allele distribution (Ala carriers vs non-Ala carriers) and the lipodystrophy phenotype (OR = 0.92; 95%CI: 0.16-1.87); similar results were obtained after adjusting for age (OR = 1.03; 95%CI: 1.0-1.6) and gender (OR = 0.55; 95%CI: 0.32-0.95).

The relationship between the *PPAR γ* Pro12Ala SNP and metabolic variables in all HIV-1-infected subjects was assessed. In the univariate analyses, patients carrying the common Pro/Pro genotype had lower plasma cholesterol levels than carriers of the variant X/Ala genotype: 5.1 ± 1.3 mmol/L vs 5.6 ± 1.3 mmol/L, $p = 0.020$ for total cholesterol, and 2.9 ± 1.1 mmol/L vs 3.4 ± 1.2 mmol/L, $p = 0.038$, for LDL-cholesterol. When we repeated these assessments in HIV-1-infected patients categorized according the presence or absence of lipodystrophy, we observed similar significant associations only in the subset of patients with lipodystrophy: plasma total cholesterol was 5.3 ± 1.4 mmol/L in carriers of the Pro/Pro genotype and 6.1 ± 1.5 mmol/L in carriers of the X/Ala genotype ($p = 0.029$); plasma LDL-cholesterol was 3.1 ± 1.1 mmol/L in persons carrying the Pro/Pro genotype and 3.9 ± 1.3 mmol/L in carriers of the variant X/Ala genotype ($p = 0.025$). These associations however were no longer significant when a multivariate analysis which included *PPAR γ* genotype, age, gender, risk

factor for HIV-1 infection, plasma viral load, HCV infection, BMI, plasma lipid and carbohydrate metabolism parameters and use of the different antiretroviral drugs was performed. No association was found between *PPAR γ* genotype and the time elapsed for developing lipodystrophy and the severity of lipodystrophy. No differences in the genotype and allele distribution were observed between UC and HIV-1-infected patients.

PPAR γ mRNA Expression in SAT

HIV-1-infected patients, assessed as a whole, had a non-significantly decreased *PPAR γ* mRNA expression compared with UC ($p = 0.093$). With respect to the HIV-1-infected subset, those without lipodystrophy had a slightly higher value compared with that of patients with lipodystrophy ($p = 0.216$) (Fig. 1). The lowest *PPAR γ* mRNA expression was observed in HIV-1-infected patients with lipodystrophy ($p = 0.054$ compared with UC). We also assessed whether the *PPAR γ* Pro12Ala SNP influences the *PPAR γ* mRNA expression in SAT. The main effect was observed in the subset of patients with lipodystrophy: those carrying the common Pro/Pro alleles had lower *PPAR γ* mRNA expression than that of the X/Ala carriers: 0.5017 ± 0.1891 (median 0.4524) vs 0.8327 ± 0.3081 (median 0.7418), $p = 0.015$. The small number of patients assessed however demands caution when interpreting our data. Correlation analyses showed that *PPAR γ* mRNA expression was positively correlated with plasma total cholesterol ($r = 0.311$; $p = 0.054$) and plasma LDL-cholesterol ($r = 0.43$; $p = 0.018$), and negatively with plasma insulin ($r = -0.45$; $p = 0.005$), HOMA ($r = -0.43$; $p = 0.008$) and BMI ($r = -0.28$; $p = 0.031$). These significant correlations were observed only when all HIV-1-infected subjects were analysed together.

DISCUSSION

This genetic association study showed that there is no relationship between the *PPAR γ* Pro12Ala SNP and the presence of lipodystrophy and/or metabolic derangements in Spanish HIV-1-infected subjects under HAART. On the

Table 2. Genotype Distribution and Allele Frequencies of the *PPAR γ* Pro12Ala Polymorphism in Healthy Subjects and HIV-1 Infected Subjects with and without Lipodystrophy

<i>PPARγ</i> Pro12Ala Genotype and Allele Frequencies	All Subjects (n = 362)			HIV-1 Infected (n = 278)		
	Uninfected Controls (n = 84) n (%)	HIV-1 Infected Patients (n = 278) n (%)	p	Without Lipodystrophy (n = 139) n (%)	with Lipodystrophy (n = 139) n (%)	p
C/C Pro/Pro	78 (92.9)	239 (86)	0.2	119 (85.6)	120 (86.3)	0.9
G/C Pro/Ala	6 (7.1)	37 (13, 3)		19 (13.7)	18 (12.9)	
G/G Ala/Ala	0 (0)	2 (0.7)		1 (0.7)	1 (0.7)	
C/C	78 (92.9)	239 (86)	0.13	119 (85.6)	120 (86.3)	1
G/G + C/G	6 (7.1)	39 (14)		20 (14.4)	19 (13.7)	
Allele C	162 (96.4)	515 (92.60)	0.08	257 (92.4)	258 (92.8)	0.87
Allele G	6 (3.6)	41 (7.4)		21 (7.6)	20 (7.2)	

Results are expressed as n (%). Genotype distribution and allele frequencies in the uninfected controls and in the HIV-1 infected patients was in accordance to the expected Hardy-Weinberg equilibrium. DNA for genotyping was available from 84/105 uninfected controls.

other hand, we found that PPAR γ mRNA expression in SAT is under genetic control at least in patients with lipodystrophy. Our HIV-1-infected patients with lipodystrophy had a near-significantly reduced expression of PPAR γ in SAT compared with uninfected controls. We confirm that patients with lipodystrophy have a better CD4+ T-cell recovery, high prevalence of AIDS and a greater exposure to HAART, particularly to NRTI and PI. Furthermore, patients with lipodystrophy had a significantly higher prevalence of lipid and glucose metabolism disturbances [34, 35].

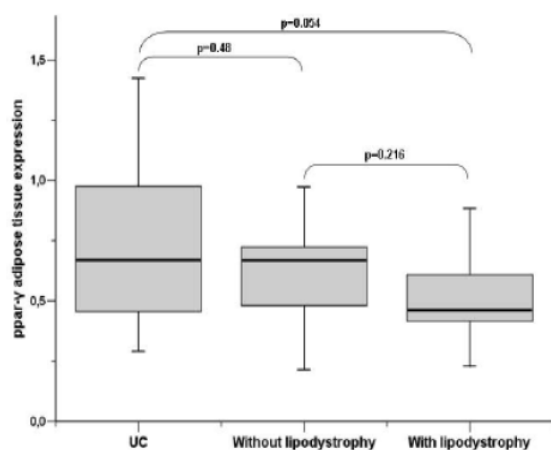


Fig. (1). PPAR γ mRNA expression in adipose tissue in HIV-1-infected subjects with and without lipodystrophy and in uninfected controls. PPAR γ mRNA levels are normalized with the mRNA expression of two housekeeping genes (weighted mean of β -actin and cyclophilin). Whiskers are 95%CI, boxes represent interquartile range, and bars are median. UC: uninfected controls.

The pathogenesis of HAART-related lipodystrophy in HIV-1-infected persons is still a medical mystery. Some protease inhibitors have been involved in disturbances of adipocyte differentiation while NRTI, particularly D4T, may cause adipocyte apoptosis [3]. The cumulative effect of both actions may result in an imbalance between adipocyte production and destruction leading to adipocyte loss and, hence, lipodystrophy. Not all patients that receive the same treatment and have a similar immunologic and virologic scenario develop lipodystrophy and metabolic derangements, so, a host, genetically-driven, vulnerability has been suggested. From the mechanistic point of view, PPAR γ is a good candidate gene to be studied in this respect because it is involved in the regulation of adipogenesis, lipid storage, insulin and glucose metabolism [36]. Furthermore, PPAR γ controls the expression of proteins such as leptin, adiponectin and tumour necrosis factor α (TNF- α), all these related with lipodystrophy [37]. Additionally, rare loss-of-function PPAR γ gene mutations which are associated with a decreased transcriptional activity, can cause familial partial lipodystrophy, a syndrome that is characterized by an altered distribution of subcutaneous fat together with features of the metabolic syndrome [26, 27], findings that share similarities with HAART-associated lipodystrophy. Association studies between the PPAR γ Pro12Ala SNP and adiposity, diabetes and dyslipidaemia in non-HIV-infected subjects already exist and offer discordant results [18-20, 38-43], but few data are

available regarding this aspect in HIV-1-infected persons [44]. Our findings indicate that there is no relationship between the PPAR γ Pro12Ala SNP and lipodystrophy. The effect of the PPAR γ Pro12Ala SNP on lipid metabolism parameters has been widely studied in genetic association studies in non-HIV-infected patients, with inconsistent data [18, 38-43]. Some studies found an association between the X12Ala genotype and a higher total- and LDL-cholesterol both in non diabetic [41] and diabetic subjects [42]; in others no associations were detected [18, 38-40, 43]. Although our data suggest that this polymorphism may modulate the risk of hypercholesterolemia in HIV-1-infected patients with lipodystrophy at the univariate analysis, this modulator effect was lost when a multivariate approach was performed. With respect to carbohydrate metabolism parameters, we observed a lack of association between PPAR γ Pro12Ala SNP and disturbances in plasma glucose and insulin metabolism. This contrasts with previous studies in non HIV-infected subjects which found an association between X12Ala and insulin sensitivity and a decreased risk of diabetes mellitus, although data are conflicting [18, 28, 38-40]. Discordant results between studies may be due to the heterogeneity of the populations studied and the multifactorial environmental and polygenic origin of these disorders.

Additional findings from our study indicate that PPAR γ mRNA expression in subcutaneous adipose tissue from HIV-1-infected subjects with lipodystrophy showed a trend to be lower compared to UC and patients without lipodystrophy. We therefore confirm the findings reported by some authors [10, 11, 45] but disagree with others [9]. In the latter report [9], 30 HIV-1-infected subjects with lipodystrophy with or without lipohypertrophy (similar to us) were assessed, and PPAR γ mRNA expression was significantly lower in patients with lipodystrophy compared with those without. In this study, at the moment when the SAT biopsy was made, 73% of patients were taken a PI-based regimen, while in our study this number was 16%, although most had been used PI in the past. Additionally, only 11% of our patients were currently receiving d4T when biopsied (these numbers are not provided in other reports). The differences in the antiretroviral drugs that the patients were using when were biopsied offers a plausible explanation for discrepancies, given the different effects that different antiretroviral drugs exert on PPAR γ . Several *in vitro* studies with pre-adipocyte cells treated with antiretroviral agents, have shown a decreased expression of PPAR γ and other adipocyte transcriptional factors, together with a decrease in the synthesis of enzymes implicated in lipid and glucose metabolism [12-14, 46, 47]. Thymidine analogues (d4T and AZT) and efavirenz can also lower PPAR γ expression in differentiating adipocytes [47-49]. Apart from the drug-related effects, PPAR γ activity may be altered in HIV-1-infected persons due to TNF- α dysregulation [50, 51]. Viral-dependent factors may also play a role, as suggested by the finding of a decreased expression of the PPAR γ gene in adipose tissue of untreated HIV-1-infected patients, thus suggesting a direct effect of HIV-1 on adipose tissue [45], perhaps through a direct effect from some viral proteins. In this way, Vpr is able to inhibit PPAR γ activity in pre-adipocyte cells [15] whereas Nef has been shown to suppress PPAR γ expression and reduce fatty acid levels in human T and macrophage cell lines [16]. Finally, host-genetic

PPAR γ SNP in HIV-1-Infected Patients

Current HIV Research, 2009, Vol. 7, No. 5 7

determinants could also influence PPAR γ activity in SAT, as our study suggests, given that in patients with lipodystrophy those with the *X/Ala* genotype showed greater PPAR γ expression. This finding agrees with data from a previous study performed on massively obese men [52].

In conclusion, our study suggests that there is no association between carriage of the *PPAR γ 12Ala* genetic variant and the risk of HAART-related lipodystrophy and its associated metabolic derangements in Spanish HIV-1-infected patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 02/1282; 04/1752, 04/0377, 05/1591, 05/1944 and 07/0976); the Fundació La Marató de TV3 (02/1830 and 02/1910), the Fundació Ferrán, the Fundació para la Investigación y Prevención del Sida en España (FIPSE 06/36572, 06/36610 and 36718/08); the Red de Investigación en Sida (RIS, RD06/006), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain. Maria Saumoy was the recipients of a research career award from the Instituto de Salud Carlos III, Spain.

APPENDIX

The members of the HIV Lipodystrophy Study Group and co-authors of this paper are: Carmen Aguilar, Teresa Suguet, Montserrat Broch, Eva González, Miguel López-Dupla, Joaquim Peraire, Cristóbal Richart, Marta Sanjuán, Maria Saumoy, Amadeu Sauri, Joan-Josep Sirvent, Montserrat Vargas, Sergi Veloso, Joan Vendrell, Francesc Vidal, Consuelo Viladés (Hospital Universitari Joan XXIII, IISPV, and Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain); Carlos Alonso-Villaverde, Blai Coll, Gerard Aragonés, Sandra Parra, Lluís Masana (Hospital Universitari de Sant Joan, IISPV, and Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain); Pere Domingo, Àngels Fontanet, M^a Mar Gutiérrez, M^a Gràcia Mateo, Jessica Muñoz, M^a Antònia Sambeat (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain).

REFERENCES

[1] Stankov MV, Behrens GM. HIV-therapy associated lipodystrophy: experimental and clinical evidence for the pathogenesis and treatment. *Endocr Metab Immun Disord Drug Targets* 2007; 7: 237-49.
[2] Grigem S, Fischer-Posovszky P, Debatin KM, *et al*. The effect of the HIV protease inhibitor ritonavir on proliferation, differentiation, lipogenesis, gene expression and apoptosis of human preadipocytes and adipocytes. *Horm Metab Res* 2005; 37: 602-9.
[3] Domingo P, Vidal F, Domingo JC, *et al*. Tumor necrosis factor alpha in fat redistribution syndromes associated with combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients: potential role in subcutaneous adipocyte apoptosis. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 771-80.
[4] Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 1999; 354: 141-8.
[5] Touyz RM, Schiffrin EL. Peroxisome proliferators-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. *Vasc Pharmacol* 2006; 45: 19-28.
[6] Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, *et al*. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation?. *J Intern Med* 2007; 262: 184-98.
[7] Gurnell M. PPAR γ and metabolism: insights from the study of human genetic variants. *Clin Endocrinol* 2003; 59: 267-77.

[8] Knouff C, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. *Endocr Rev* 2004; 25: 899-918.
[9] Kannisto K, Sutinen J, Korshennikova E, *et al*. Expression of adipogenic transcription factors, peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1, IL-6 and CD45 in subcutaneous adipose tissue in lipodystrophy associated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2003; 17: 1753-62.
[10] Jan V, Cervera P, Maachi M, *et al*. Altered fat differentiation and adipocytokine expression are inter-related and linked to morphological changes and insulin resistance in HIV-1-infected lipodystrophic patients. *Antivir Ther* 2004; 9: 555-64.
[11] Bastard JP, Caron M, Vidal H, *et al*. Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipotrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet* 2002; 359: 1026-31.
[12] Dowel P, Flexner C, Kwiterovich PO, *et al*. Suppression of preadipocyte differentiation and promotion of adipocyte death by HIV protease inhibitors. *J Biol Chem* 2000; 275: 41325-32.
[13] Pacenti M, Barxzon L, Favaretto F, *et al*. Microarray analysis during adipogenesis identifies new genes altered by antiretroviral drugs. *AIDS* 2006; 20: 1691-705.
[14] Gougeon ML, Penicaud L, Fromenty B, *et al*. Adipocytes targets and actors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy and metabolic alterations. *Antivir Ther* 2004; 9: 161-77.
[15] Shrivastav S, Kino T, Cunningham T, *et al*. Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 viral protein R suppresses transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor γ and inhibits adipocyte differentiation: implications for HIV-associated lipodystrophy. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 234-47.
[16] Otake K, Omoto S, Yamamoto T, *et al*. HIV-1 Nef protein in the nucleus influences adipogenesis as well as viral transcription through the peroxisome proliferator-activated receptors. *AIDS* 2004; 18: 189-98.
[17] Meirhaeghe A, Amouyel P. Impact of genetic variation of PPAR γ in humans. *Mol Genet Metab* 2004; 83: 93-102.
[18] Buzzetti R, Petrone A, Ribaudo MC, *et al*. The common PPAR- γ 2 Pro12Ala variant is associated with greater insulin sensitivity. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 1050-4.
[19] Ochoa MC, Martí A, Martínez JA. Estudios sobre la obesidad en genes candidatos. *Med Clin (Barc)* 2004; 122: 542-51.
[20] Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, *et al*. A Pro12Ala substitution in PPAR- γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 1998; 20: 284-7.
[21] Masugi J, Tamori Y, Mori H, *et al*. Inhibitory effect of a proline-to-alanine substitution at codon 12 of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 on thiazolidinedione-induced adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268: 178-82.
[22] Stumvoll M, Häring H. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes* 2002; 51: 2341-7.
[23] Horiki M, Ikegami H, Fujisawa T, *et al*. Association of Pro12Ala polymorphism of PPAR γ gene with insulin resistance and related diseases. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 66S: S63-S67.
[24] Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, *et al*. A genetic polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ influences plasma leptin in obese subjects. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 435-40.
[25] Meirhaeghe A, Cotel D, Amouyel P, *et al*. Association between peroxisome proliferator-activated receptor γ haplotypes and the metabolic syndrome in French men and women. *Diabetes* 2005; 54: 3043-8.
[26] Hegele RA. Lessons from human mutations in PPAR γ . *Intern J Obes* 2005; 29: S31-S35.
[27] Semple RK, Chatterjee VKK, O'Rahilly S. PPAR γ and human metabolic disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 581-9.
[28] Monajemi H, Zhang L, Li G, *et al*. Familial partial lipodystrophy phenotype resulting from a single-base mutation in deoxyribonucleic acid-binding domain of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1606-12.
[29] Lüdtkke A, Buettner J, Schmidt HH, *et al*. New PPAR γ mutation leads to lipodystrophy and loss of protein function that is partially restored by a synthetic ligand. *J Med Genet* 2007; 44: 1-5.
[30] Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, *et al*. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy,

- hyperlipidaemia and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* 1999; 353: 2093-9.
- [31] Saumoy M, López-Dupla M, Veloso S, *et al.* A study on the IL-6 system in HIV-1-infected patients. *AIDS* 2008; 22: 893-6.
- [32] Christeff N, Melchior JC, de Truchis P, *et al.* Lipodystrophy defined by a clinical score in HIV-infected men on highly active antiretroviral therapy: correlation between dyslipidaemia and steroid hormone alterations. *AIDS* 1999; 13: 2251-60.
- [33] Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination. *JAMA* 2002; 287: 356-9.
- [34] Hadigan C, Meigs JB, Corcoran C, *et al.* Metabolic abnormalities and cardiovascular disease risk factors in adults with human immunodeficiency virus infection and lipodystrophy. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 130-9.
- [35] HIV Lipodystrophy Case definition Study Group. An objective case definition of lipodystrophy in HIV-1-infected adults: a case-control study. *Lancet* 2003; 361: 726-35.
- [36] Giralt M, Domingo P, Villarroya F. HIV-1 infection and the PPAR-dependent control of adipose tissue physiology. *PPAR Research* 2009; 1: 1-8.
- [37] Lagathu C, Kim M, Maachi M, *et al.* HIV antiretroviral treatment alters adipokine expression and insulin sensitivity of adipose tissue *in vitro* and *in vivo*. *Biochimie* 2005; 87: 65-71.
- [38] Shoyong-Tai E, Corella D, Deurenberg-Yap M, *et al.* Differential effects of the C143T and Pro12Ala PPAR γ gene variants on plasma lipids and diabetes risk in an Asian population. *J Lipid Res* 2004; 45: 674-85.
- [39] González SJL, Serrano RM, Fernández PC, *et al.* Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ -2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 495-501.
- [40] Linda-Kao WH, Coresh J, Shuldiner AR, *et al.* Pro12Ala of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 gene is associated with lower serum insulin levels in nonobese African Americans. *Diabetes* 2003; 52: 1568-72.
- [41] Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, *et al.* Impact of the peroxisome proliferator activated receptor γ 2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Intern J Obes* 2000; 24: 195-9.
- [42] Zietz B, Barth N, Spiegel D, *et al.* Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR γ 2) is associated with higher levels of total cholesterol and LDL-cholesterol in male Caucasian type 2 diabetes patients. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2002; 110: 60-66.
- [43] Hamada T, Kotani K, Tsuzaki K, *et al.* Association of Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene with small dense low-density lipoprotein in the general population. *Metabolism* 2007; 56: 1345-9.
- [44] Zanone PB, Riva A, Nasi M, *et al.* Genetic polymorphisms differently influencing the emergence of atrophy and fat accumulation in HIV-related lipodystrophy. *AIDS* 2008; 22: 1769-78.
- [45] Caron M, Auclair M, Vigouroux C, *et al.* The hiv protease inhibitor indinavir impairs sterol regulatory element-binding protein-1 intranuclear localization, inhibits preadipocyte differentiation and induces insulin resistance. *Diabetes* 2001; 50: 1378-88.
- [46] Viengchareun S, Cron M, Auclair M, *et al.* Mitochondrial toxicity of indinavir, stavudine and zidovudine involves multiple cellular targets in white and brown adipocytes. *Antivir Ther* 2006; 12: 919-29.
- [47] Caron M, Auclair M, Lagathu C, *et al.* The HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors stavudine and zidovudine alter adipocyte functions *in vitro*. *AIDS* 2004; 18: 2117-36.
- [48] El Hadri K, Glorian M, Monsempe C, *et al.* *In vitro* suppression of the lipogenic pathway by the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz in 3T3 and human preadipocyte or adipocytes. *J Biol Chem* 2004; 279: 15130-41.
- [49] Suzawa M, Takada I, Yanagisawa J, *et al.* Cytokines suppress adipogenesis and PPAR- γ function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 224-30.
- [50] Kudo M, Sagawara A, Urano A, *et al.* transcription suppression of peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 gene expression by tumor necrosis factor α via an inhibition of CCAAT/enhancer-binding protein δ during the early stage of adipocyte differentiation. *Endocrinology* 2004; 145: 4948-56.
- [51] Giralt M, Domingo P, Guallar JP, *et al.* HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy. *Antivir Ther* 2006; 11: 729-40.
- [52] Kolehmainen M, Uusitupa MJJ, Alhava E, *et al.* Effect of the Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 2 gene on the expression of PPAR γ target genes in adipose tissue of massively obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1717-22.

DISCUSSIÓ

ESTUDI 1. **Human subcutaneous adipose tissue *LPIN1* expression in obesity, type 2 diabetes mellitus, and human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy syndrome**

És un estudi de cassos i controls, transversal, en el que es va analitzar l'expressió de *LPIN1* en teixit adipós subcutani de 37 pacients amb infecció pel VIH en tractament amb TARGA, dels quals 24 presentaven LD i 13 no i 21 controls no infectats pel VIH.

Respecte els pacients amb infecció pel VIH, el 96% dels pacients amb LD estaven en tractament amb estavudina respecte el 69% dels pacients sense LD. No vam trobar altres diferències en el TARGA, variables antropomètriques, lipídiques o glicèmiques.

L'ARNm de *LPIN1* va ser més elevat en els pacients amb infecció pel VIH que en el grup control, sense diferències entre els pacients amb i sense LD. Donat l'absència d'un grup de pacients infectats però sense TARGA, no podem discernir si aquesta troballa és deguda al propi VIH o al TARGA. Els nostres resultats contrasten amb un estudi recentment publicat en el que els pacients amb LD presenten uns nivells de *LPIN1* inferiors en relació a pacients sense LD (70).

L'expressió de *LPIN1* en teixit adipós subcutani, en el conjunt de pacients amb infecció pel VIH, es va correlacionar positivament amb la sensibilitat a la insulina mesurada mitjançant el test de tolerància a la glucosa endovenosa de mostres múltiples. Estudis previs també han corroborat aquesta associació (138). S'ha postulat que la *LPIN1* podria actuar com un regulador dels nivells d'àcid fosfatidat cel·lular que participen en diferents mecanismes intracel·lulars, incloent l'homeostasis de la glucosa (139). Ademés, en el nostre estudi, els pacients en tractament amb IP, fàrmacs associats a RI tenen uns nivells menors d'ARNm de *LPIN1* en comparació amb els pacients en els que el seu TARGA no inclou un IP(140). Aquestes troballes permeten especular el possible paper de la *LPIN1* com a modulador de la RI induïda pels IP.

L'ARNm de *LPIN1* s'ha correlacionat positivament amb l'ARNm de *PPAR γ* i negativament amb l'ARNm d'*IL-6* i *TNF α* en els pacients amb infecció pel VIH. Tant l'ARNm de *PPAR γ* com de

TNF α es van mantenir com a determinants de l'expressió de LPIN1 en l'anàlisi multivariat ajustat per sexe i LD. Aquestes troballes fan pensar que el TNF- α , pot modular l'expressió de LPIN1 en els pacients VIH fet diferencial a altres trastorns associats a RI.

ESTUDI 2. **The IL-6 system in HIV-1-infection and in HAART-related fat redistribution syndromes**

El present estudi aporta nous coneixements sobre el paper de la IL-6 en la infecció pel VIH i en la LD associada al TARGA

És un estudi muticèntric, de cassos i controls, a on es va analitzar la distribució genotípica i al·lèlica del polimorfisme *-174 G>C* en el gen de *IL-6* en una cohort de 414 persones no infectades pel VIH i 299 persones infectades comparables en edat i sexe. Dels pacients amb infecció pel VIH 143 presentaven LD moderada o severa i 156 no en presentaven. En un subgrup d'individus es va determinar l'expressió d'ARNm d'IL-6 en teixit adipós subcutani i els nivells plasmàtics d'IL-6.

De les característiques clíniques dels individus amb infecció pel VIH cal destacar que els pacients amb LD van presentar una major recuperació del número de limfòcits T CD4+, un major ús acumulat tant de INTI com de d4T, així com uns nivells més elevats d'insulina, TG, CT, LDL-c i HDL-c i un IMC i una relació cintura/maluc superior en comparació als pacients sense LD.

El polimorfisme *-174 G>C* de la *IL-6* no va modular el risc de desenvolupar LD o alteracions metabòliques en pacients amb infecció pel VIH i TARGA, així com tampoc va modular la rapidesa d'instauració de la LD. Recentment, un altre estudi tampoc ha trobat relació entre aquest polimorfisme i la dislipèmia o la RI en pacients amb infecció per VIH i TARGA (110).

Tampoc hem trobat relació entre el polimorfisme i els nivells plasmàtics d'IL-6 ni l'expressió d'IL-6 en teixit adipós subcutani. Per tant, el polimorfisme estudiat de la *IL-6* no modula la producció local ni sistèmica d'IL-6 en la població analitzada.

En relació a la patogènesi de la infecció pel VIH hem trobat que el genotip *C/C* i l'al·lel *C* van ser significativament més freqüents en el grup d'individus no infectats pel VIH, pel que aquest

polimorfisme podria modular el risc d'infecció pel VIH. Aquestes troballes contrasten amb les descrites en un altre estudi, en el qual no es troben diferències en la distribució del polimorfisme -174G>C entre donants de sang no infectats pel VIH i persones infectades pel VIH tot i que el número de pacients analitzats és baix per un estudi genètic (141). La IL-6 té un paper important en la resposta inicial a la infecció per una acció tant sobre la immunitat innata com humoral (142). Ambdós tipus d'immunitat estan involucrades en les primeres etapes de la infecció pel VIH, pel que és biològicament plausible investigar l'efecte modulador de les variants genètiques de la IL-6 en la vulnerabilitat de la infecció pel VIH. Cal destacar que en el nostre estudi el grup control són donadors de sang no infectats sense factors de risc coneguts per VIH, fet que dificulta la valoració dels resultats i recomana precaució en la interpretació dels mateixos. Un grup exposat al VIH i no infectat seria el grup control ideal per analitzar aquesta vulnerabilitat. El polimorfisme -174G>C, en persones infectades pel VIH, també s'ha associat a risc de sarcoma de Kaposi (143) i a una major recuperació de limfòcits CD4+ per TARGA (144)

Tant la producció local com sistèmica d'IL-6 estan incrementades en pacients amb infecció pel VIH respecte controls no infectats. Aquesta troballa ja s'havia descrit prèviament (145) i pot estar relacionada amb el fenomen inflamatori que acompanya a la infecció pel VIH. En el nostre estudi no trobem diferències en els nivells plasmàtics ni en l'expressió d'IL-6 en teixit adipós entre els pacients amb/sense LD, així com tampoc s'han relacionat amb els IP analitzats de forma individual que prenen els pacients. Aquestes troballes indiquen un efecte directe del propi VIH i/o del TARGA sobre el teixit adipós que provocaria un augment de la síntesis local d'IL-6 i consegüentment dels nivells plasmàtics independentment de la presència/absència de LD. En el nostre estudi no podem discernir si l'increment local i sistèmic d'IL-6 és degut al VIH o al TARGA ja que no hem analitzat un grup de pacients amb infecció pel VIH sense TARGA.

En la nostra cohort, l'únic factor predictor independent de desenvolupament de LD va ser la duració de l'exposició a estavudina, relació ja descrita prèviament en altres estudis (38).

ESTUDI 3. *PPAR γ Pro12Ala* polymorphism in HIV-1-infected patients with HAART-related lipodystrophy

Es tracta d'un estudi muticèntric de cassos i controls a on es va analitzar la distribució genotípica i al·lèlica del polimorfisme *Pro12Ala* del *PPAR γ* en una cohort de 278 persones infectades pel VIH, dels quals 139 presentaven LD moderada o severa i 139 no presentaven LD i 105 persones no infectades pel VIH. En un subgrup d'individus es va determinar l'expressió d'ARNm de *PPAR γ* en teixit adipós subcutani.

Pel que fa a les característiques clíniques dels pacients amb infecció pel VIH cal destacar que els pacients amb LD van presentar una major recuperació del número de limfòcits T CD4+, un major ús acumulat tant de INTI com de d4T, així com uns nivells més elevats d'insulina, TG, CT, LDL-c i HDL-c i un IMC i una relació cintura/maluc superior en comparació als pacients sense LD.

Aquest estudi d'associació genètica va mostrar que no hi ha relació entre el polimorfisme *Pro12Ala* del *PPAR γ* i la presència de LD en pacients amb infecció pel VIH espanyols amb TARGA, així com tampoc amb la severitat ni amb el temps d'evolució a LD. Aquest polimorfisme en el gen del *PPAR γ* no havia estat estudiat prèviament en població VIH.

Els pacients amb el genotip *Pro/Pro* van presentar uns nivells de CT i LDL-c més baixos comparat amb els pacients amb genotip *X/Ala*, tant quan es van estudiar tots els pacients VIH junts com quan es va estudiar el grup de pacients amb LD. En canvi, en el grup de pacients sense LD no vam trobar aquesta associació. Tampoc es van observar diferències en la distribució genotípica ni al·lèlica entre els controls sans i els pacients infectats pel VIH.

Diversos estudis han analitzat l'associació d'aquest polimorfisme amb adipositat, diabetes o dislipèmia en població no VIH amb resultats discordants (129-135). Respecte la dislipèmia, alguns estudis troben una associació entre el genotip *X12Ala* i nivells més elevats de CT i LDL-c

en individus no diabètics i diabètics (146,147), en concordància amb el nostre estudi, tot i que altres estudis no troben dita associació (132,148). Les nostres dades suggereixen que aquest polimorfisme pot modular el risc d'hipercolesterolèmia en pacients infectats pel VIH, encara que amb l'anàlisi multivariat aquest efecte desapareix. En relació al metabolisme de la glucosa no trobem cap relació entre el polimorfisme i la glucosa o la insulina plasmàtica, en contra d'estudis realitzats en la població no infectada pel VIH en que descriuen una associació entre X/12Aa i la sensibilitat a la insulina i la disminució en el risc de diabetes mellitus tipus 2 (132,149). La discordància de resultats entre estudis pot ser atribuïda a l'heterogeneïtat de les poblacions estudiades així com al caràcter multifactorial i poligènic d'aquests trastorns.

Hem trobat una disminució no significativa en l'expressió d'ARNm de PPAR γ en els pacients amb LD respecte el grup d'individus no infectats. Aquests resultats estan en concordància amb estudis previs (53,59). En el nostre treball no trobem diferències en l'expressió d'ARNm entre els pacients amb/sense LD, en desacord amb altres autors que troben uns nivells d'ARNm més baixos en els pacients amb LD (60). Cal tenir en compte que els estudis mencionats varien en metodologia ja que algun d'ells no inclou un grup de pacients sense LD (53,59) o un grup de pacients sense infecció pel VIH (60). Ademès els pacients poden tenir diferent patró de LD (lipoatròfia vs LD mixta o lipohipertròfia) i rebre una pauta de TARGA amb diferents efectes sobre l'expressió gènica. En aquest sentit només el 16% dels nostres pacients rebien un IP en contrast amb el 73% del grup de Kannisto (60) i el 11% dels pacients del nostre estudi rebien d4T en el moment de la biòpsia, desconeixent el percentatge en l'estudi mencionat. Aquestes diferències entre l'ús de IP en el moment de la biòpsia podria ser una explicació plausible de les diferències trobades entre estudis, donat l'efecte variable que els diferents antiretrovirals exerceixen sobre l'expressió de PPAR γ .

Hi ha diversos factors que poden estar relacionats amb l'expressió disminuïda de PPAR γ en els pacients amb LD. El TARGA probablement jugarà un paper important com demostren els estudis *in vitro* (54-57,128). Per un altre costat, s'ha vist que pacients sense TARGA tenen uns

nivells d'ARNm de PPAR γ inferiors als de la població no infectada suggerint un paper per part del propi VIH (83). Tant la proteïna viral Nef com la proteïna Vpr han demostrat una inhibició de l'expressió d'ARNm de PPAR γ en línees cel·lulars de preadipòcits o cèl·lules T humanes i macròfags respectivament (84,85). La disregulació de les citoquines proinflamàtores com el TNF- α i la IL-6 s'ha relacionat amb una disminució de l'activitat de PPAR γ (53,59,60). Finalment i tal com suggereix el nostre estudi, al trobar una menor expressió d'ARNm de PPAR γ en els portadors del genotip *Pro/Pro*, pot existir una variabilitat genètica en l'expressió de PPAR γ , tot i que el número reduït de pacients analitzats demana precaució en la interpretació dels resultats.

CONCLUSIONS

Estudi 1: Human subcutaneous adipose tissue LPIN1 expression in obesity, type 2 diabetes, and human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy syndrome

- Objectiu primari:

Els pacients amb infecció pel VIH en tractament amb TARGA tenen una expressió d'ARNm de LPIN1 en teixit adipós més elevada que els pacients sense infecció pel VIH, sense diferències entre pacients amb/sense LD.

- Objectius secundaris:

a) L'expressió d'ARNm de LPIN1 en teixit adipós de pacients amb infecció pel VIH es correlaciona positivament amb l'expressió d'ARNm de PPAR γ .

b) L'expressió d'ARNm de LPIN1 en teixit adipós de pacients amb infecció pel VIH es correlaciona negativament amb l'expressió de citoquines proinflamatòries (IL-6 i TNF- α).

c) L'expressió d'ARNm de LPIN1 en teixit adipós de pacients amb infecció pel VIH es correlaciona positivament amb la sensibilitat a la insulina.

Estudi 2 The IL-6 system in HIV-1-infection and in HAART-related fat redistribution syndromes

- Objectiu primari:

a) El polimorfisme -174 G>C del gen de la IL-6 no està relacionat amb la LD en pacients VIH que reben TARGA.

b) Hi ha una hiperproducció local (teixit adipós) i sistèmica d'IL-6 en els pacients infectats pel VIH que reben TARGA. Aquesta hiperproducció no està modulada per la presència de LD

Conclusions

- Objectius secundaris:

- a) El genotip *C/C* i l'al·lel *C* de la *IL-6* han sigut significativament més freqüents en els individus no infectats pel VIH, pel que aquest polimorfisme podria estar involucrat amb la vulnerabilitat a la infecció pel VIH
- b) El polimorfisme *-174 G>C* del gen de la *IL-6* no influeix en els nivells plasmàtics d'IL-6 ni en l'expressió d'IL-6 en teixit adipós subcutani.
- c) El polimorfisme *-174 G>C* del gen de la *IL-6* no modula el metabolisme lipídic ni glicèmic en pacients amb VIH i TARGA

Estudi 3: PPAR γ Pro12Ala polymorphism in HIV-1-infected patients with HAART-related lipodystrophy

- Objectius primaris:

- a) No existeix una associació entre el polimorfisme *Pro12Ala* del *PPAR γ* i el risc de desenvolupar LD associada al TARGA.
- b) L'expressió d'ARNm de *PPAR γ* va ser inferior en els pacients amb LD respecte el grup d'individus no infectats, sense diferències respecte els pacients sense LD.

- Objectius secundaris:

- a) No observem diferències en la distribució genotípica ni al·lèlica del polimorfisme *Pro12Ala* del *PPAR γ* entre els controls sans i els pacients infectats pel VIH.
- b) Els pacients amb el genotip *Pro/Pro* tenen una expressió d'ARNm de *PPAR γ* menor que els *X/Ala*
- c) Els pacients amb el genotip *Pro/Pro* van presentar uns nivells de CT i LDL-c més baixos comparat amb els pacients amb genotip *X/Ala*, tant quan es van estudiar tots els pacients VIH junts com quan es va estudiar el grup de pacients amb LD.

BIBLIOGRAFIA

1. Gottlieb MS, Serhoff R, Schanker HM, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 1981;305:1425-1431.
2. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO) AIDS epidemic update: November 2009. ONUSIDA. www.unaids.org.
3. Centre d'Estudis Epidemiològics sobre la SIDA de Catalunya (CEESCAT). Sistema integrat de vigilància epidemiològica de l'HIV/ITS a Catalunya (SIVES). Informe anual. Barcelona: Generalitat de Catalunya, Departament de Salut 2009.
4. Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 2002; 8:673-680.
5. Alcamí J. The HIV replication cycle. Established therapeutic targets and potencial targets. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2008; 26 Suppl 12:3-10.
6. Alcamí J, Laín de Lera T, Folgueira L, et al. Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO J* 1995; 14:1552-1560.
7. Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, Greene WL. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* 2005; 435:108-114.
8. Von Schwedler UK, Stuchell M, Müller B, et al. The protein network of HIV budding. *Cell* 2003; 114:701-713.
9. Alcamí J. Advances in the immunopathology of HIV infection. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2004; 22:486-496.
10. Yarchoan R, Klecker RW, Weinhold KJ, et al. Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet* 1986; 1:575-580.
11. El Safadi Y, Vivet-Boudou V, Marquet R. HIV reverse transcriptase inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 75:723-737.

12. Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, *et al.* A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cells counts from 200 to 500 per cubic millimeter. *N Engl J Med* 1996; 335:1091-1098.
13. Noble S, Faulds D. Saquinavir.a review of its pharmacology and clinical potential in the management of HIV infection. *Drugs* 1996; 52:93-112.
14. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1998; 338:853-60.
15. Cervia JS, Smith MA Enfuvirtide (T-20): a novel human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitor. *Clin Infect Dis* 2003; 37:1102-1106.
16. Nair V, Chi G. HIV integrase inhibitors as therapeutic agents in AIDS. *Rev Med Vir* 2007; 17:277-295.
17. Finzi D, Blankson J, Siliciano J D. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999; 5:512-517.
18. Vella S, Palmisano L. The global status of resistance to antiretroviral drugs. *Clin Infect Dis* 2005; 41:S239-S246.
19. De Béthume MP. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI, their discovery, development, and use in the treatment of HIV-infection: a review of the last 20 years (1989-2009). *Antiviral Res* 2010; 85:75-90.
20. Wensing AM, van Maarseveen NM, Nijhuis M. Fifteen years to HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antiviral Res* 2010; 85:59-74.
21. Hunt JS, Romanelli F. Maraviroc, a CCR5 coreceptor antagonist that blocks entry of human immunodeficiency virus type 1. *Pharmacotherapy* 2009; 29:295-304.
22. Panel de expertos de GESIDA y Plan Nacional sobre SIDA. Documento de consenso del Grupo de Estudio de Sida/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antiretroviral en adultos infectados por el visrus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:362.e1-362.e91

23. DHHS Panel on Adult and Adolescent Antiretroviral Treatment Guidelines. http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/AA_tables.pdf.
24. Thompson MA, Aberg JA, Cahn P, *et al.* Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection:2010 Recommendations of the International AIDS Society USA Panel. *JAMA* 2010;304:321-333.
25. Montaner JS, Côté HC, Harris M, *et al.* Nucleoside-related mitochondrial toxicity among HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: insights from the evaluation of venous lactic acid and peripheral blood mitochondrial DNA. *Clin Infect Dis* 2004; 38:S73-79.
26. Mallal S, Phillips E, Carosi G, *et al.* HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med* 2008; 358:568-579.
27. Sax PE, Gallant JE, Klotman PE. Renal safety of tenofovir desoproxil fumarate. *AIDS Read* 2007; 17:90-2,99-104.
28. Martínez E, Blanco JL, Arnaiz JA, *et al.* Hepatotoxicity in HIV-infected patients receiving nevirapine-containing antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; 15:1261-1268.
29. Muñoz-Moreno JA, Fumaz CR, Ferrer MJ, *et al.* Neuropsychiatric symptoms associated with efavirenz: prevalence, correlates and management. A neurobehavioral review. *AIDS Rev* 2009; 11:103-109.
30. Carr A, Cooper DA. Images in clinical medicine. Lipodystrophy associated with an HIV-protease inhibitor. *N Engl J Med* 1998; 339:1296.
31. Viraben R, Aquilina C. Indinavir-associated lipodystrophy. *AIDS* 1998; 12:F37-39.
32. Polo R, Verdejo J, Martínez-Rodríguez S, *et al.* Lipoatrophy, fat accumulation and mixed syndrome in protease inhibitor-naive HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 25:284-286.
33. Mallewa JE, Wilkins E, Vilar J, *et al.* HIV-associated lipodystrophy: a review of underlying mechanisms and therapeutic options. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 648-660.

34. Guaraldi G, Murri R, Orlando G, *et al.* Lipodystrophy and quality of life in HIV-infected patients. *AIDS Rev* 2008; 10:752-761.
35. Worm SW, Sabin C, Weber R, *et al.* Risk of myocardial infarction in patients with HIV infection exposed to specific individual antiretroviral drugs from the 3 major drug classes: the Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (D:A:D) Study. *J Infect Dis* 2010; 201:318-330.
36. Hsue PY, Lo JC, Franklin A, *et al.* Progression of atherosclerosis as assessed by carotid intima-media thickness in patients with HIV infection. *Circulation* 2004; 109:1603-1608.
37. Carr A. HIV lipodystrophy: risk factors, pathogenesis, diagnosis and management. *AIDS* 2003; 17:S141-148.
38. Savès M, Raffi F, Capeau J, *et al.* Factors related to lipodystrophy and metabolic alterations in patients with human immunodeficiency virus infection receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2002; 34:1396-1405.
39. Podzamczar D, Ferrer E, Sanchez P, *et al.* Less lipoatrophy and better lipid profile with abacavir as compared to stavudine: 96-week results of a randomized study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 44:139-147.
40. Nguyen A, Calmy A, Schiffer V, *et al.* Lipodystrophy and weight changes: data from the Swiss HIV Cohort Study, 2000-2006. *HIV Medicine* 2008; 9:142-150.
41. Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, *et al.* Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* 1999; 353:2093-2099.
42. Martinez E, Mocroft A, Garcia-Viejo MA, *et al.* Risk of lipodystrophy in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors: a prospective cohort study. *Lancet* 2001;357:592-598.
43. Kotler DP. HIV and antiretroviral therapy: lipid abnormalities and associated cardiovascular risk in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; 49:S79-S85.

44. Wohl DA, McComsey G, Tebas P, *et al.* Current concepts in the diagnosis and management of metabolic complications of HIV infection and its therapy. *Clin Infect Dis* 2006; 43:645-653.
45. Florescu D, Kotler DP. Insulin resistance, glucose intolerance and diabetes mellitus in HIV-infected patients. *Antivir Ther* 2007; 12:149-162.
46. HIV Lipodystrophy Case Definition Study group. An objective case definition of lipodystrophy in HIV-infected adults: a case-control study. *Lancet* 2003; 361:726-735.
47. Pérez-Molina JA, Domingo P, Martínez E, Moreno S. The role of efavirenz compared with protease inhibitors in the body fat changes associated with high antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:234-245.
48. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280:E827-E847.
49. Antura-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 2008; 34:2-11.
50. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ?. A review article. *Dig Dis Sci* 2009; 54:1847-1856.
51. Valet P, Tavernier G, Castan-Laurell I, *et al.* Understanding adipose tissue development from transgenic animal models. *J Lipid Res* 2002; 43:835-860.
52. Domingo P, Matias-Guiu X, Pujol RM, *et al.* Subcutaneous adipocyte apoptosis in HIV-1 protease inhibitor associated lipodystrophy. *AIDS* 1999; 13:2261-2267.
53. Jan V, Cervera P, Maachi M, *et al.* Altered fat differentiation and adipocytokine expression are inter-related and linked to morphological changes and insulin resistance in HIV-1-infected lipodystrophic patients. *Antivir Ther* 2004; 9:555-564.
54. Pacenti M, Barzon L, Favaretto F, *et al.* Microarray analysis during adipogenesis identifies new genes altered by antiretroviral drugs. *AIDS* 2006; 20:1691-1705.

55. Lagathu C, Kim M, Maachi M, *et al.* HIV antiretroviral treatment alters adipokine expression and insulin sensitivity of adipose tissue *in vitro* and *in vivo*. *Biochimie* 2005; 87:65-71.
56. Caron M, Auclair M, Lagathu C, *et al.* The HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors stavudine and zidovudine alters adipocyte functions *in vitro*. *AIDS* 2004; 18:2127-2136.
57. Dowel P, Flexner C, Kwiterovich PO, Lane MD. Suppression of preadipocyte differentiation and promotion of adipocyte death by HIV protease inhibitors. *J Biol Chem* 2000; 275:41325-41332.
58. El Hadri K, Glorian M, Monsempes C, *et al.* *In vitro* suppression of the lipogenic pathway by the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz in 3T3 and human preadipocyte or adipocytes. *J Biol Chem* 2004; 279:15130-15141.
59. Bastard JP, Caron M, Vidal H, *et al.* Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipotrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet* 2002; 359:1026-1031.
60. Kannisto K, Sutinen J, Korshennikova E, *et al.* Expression of adipogenic transcription factors, peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1, IL-6 and CD45 in subcutaneous adipose tissue in lipodystrophy associated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2003; 17:1753-1762.
61. Miranda M, Chacón MR, Vidal F, *et al.* LMNA messenger RNA expression in highly active antiretroviral therapy-treated HIV-positive patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 46:384-389.
62. Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, *et al.* Antiretroviral drugs with adverse effects on adipocyte lipid metabolism and survival alter the expression and secretion of proinflammatory cytokines and adiponectin *in vitro*. *Antivir Ther* 2004; 9:911-920.
63. Jones SP, Janneh O, Back DJ, Pirmohamed M. Altered adipokine response in murine 3T3-F442A adipocytes treated with protease inhibitors and nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antivir Ther* 2005; 10:207-213.

64. Nagy GS, Tsiodras S, Martin LD, *et al.* Human Immunodeficiency virus type 1-related lipodystrophy and lipohypertrophy are associated with serum concentration of leptin. *Clin Infect Dis* 2003; 36:795-802.
65. Barb D, Wadhwa SG, Kratzsch J, *et al.* Circulating resistin levels are not associated with fat redistribution, insulin resistance, or metabolic profile in patients with the highly active antiretroviral therapy-induced metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5324-5328.
66. Lindegaard B, Hansen AB, Pilegaard H, *et al.* Adipose tissue expression of IL-18 and HIV-associated lipodystrophy. *AIDS* 2004; 18: 1956-1958.
67. He G, Andersen O, Haugaard SB, *et al.* Plasminogen activator inhibitor type I (PAI-I) in plasma and adipose tissue in HIV-associated lipodystrophy syndrome. Implications of adipokines. *Eur J Clin Invest* 2005; 35:583-590.
68. Lihn AS, Richelsen B, Pedersen SB, *et al.* Increased expression of TNF- α , IL-6, and IL-8 in HALS: implications for reduced adiponectin expression and plasma levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E1072-E1080.
69. Christeff N, De Truchis P, Melchior JC, *et al.* Longitudinal evolution of HIV-1-associated lipodystrophy is correlated to serum cortisol:DHEA ratio and IFN-alpha. *Eur J Clin Invest* 2002; 32:775-784.
70. Lindergaard B, Larsen LF, Hansen AB, *et al.* Adipose tissue lipin expression levels distinguish HIV patients with and without lipodystrophy. *Int J Obes (Lond)* 2007; 31:449-456.
71. Domingo D, Vidal F, Domingo JC, *et al.* Tumor necrosis factor alpha in fat redistribution syndromes associated with combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients: potential role in subcutaneous adipocyte apoptosis. *Eur J Clin Invest* 2005; 35:771-780.
72. Johnson JA, Albu JB, Engelson ES, *et al.* Increased systemic and adipose tissue cytokines in patients with HIV-associated lipodystrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286:E261-E271.
73. Ledru E, Christeff N, Petey O, *et al.* Alteration of TNF- α T cell homeostasis following potent antiretroviral therapy. Contribution to the development of HIV-associated lipodystrophy syndrome. *Blood* 2000; 95:1391-1398.

74. Addy CL, Gavrilu A, Tsiodras S, *et al.* Hypoadiponectinemia is associated with insulin resistance, hypertriglyceridemia, and fat redistribution in human immunodeficiency virus-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:627-636.
75. Miró O, López S, Cardellach F, Casademont J. Mitochondrial studies in HAART-related lipodystrophy: from experimental hypothesis to clinical findings. *Antivir Ther* 2005; 10:M73-M81.
76. Nolan D, Hammond E, Martin A, *et al.* Mitochondrial DNA depletion and morphologic changes in adipocytes associated with nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *AIDS* 2003; 17:1329-1338.
77. Miró O, López S, Pedrol E, *et al.* Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain enzyme deficiencies are present in Peripherals blood mononuclear cells of HIV-infected patients with HAART-related lipodystrophy. *Antivir Ther* 2003; 8:333-338.
78. Hommond E, Nolan D, James I, Metcalf C, Mallal S. Reduction of mitochondrial content and respiratory chain activity occurs in adipocytes within 6-12 months of commencing nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *AIDS* 2004; 18:815-817.
79. Kim MJ, Jardel C, Barthélémy C, *et al.* Mitochondrial DNA content, an inaccurate biomarker of mitochondrial alteration in human immunodeficiency virus-related lipodystrophy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1670-76.
80. Lagathu C, Eustace B, Prot M, *et al.* Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir Ther* 2007; 12: 489-500.
81. Miró O, Lopez S, Martinez E, *et al.* Mitochondrial effects of HIV infection on the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients who were never treated with antiretrovirals. *Clin Infect Dis* 2004; 39:710-716.
82. Grigem S, Fischer-Posovszky P, Debatin KM, *et al.* The effect of HIV protease inhibitor on proliferation, differentiation, lipogenesis, gene expression and apoptosis of human preadipocytes and adipocytes. *Horm Metab Res* 2005; 37:602-609.

83. Giralt M, Domingo P, Guallar 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.
84. Shrivastav S, Kino T, Cunningham T, *et al.* Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 viral protein R suppresses transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor γ and inhibits adipocyte differentiation: implications for HIV-associated lipodystrophy. *Mol Endocrinol* 2008; 22:234-247.
85. Otake K, Omoto S, Yamamoto T, *et al.* HIV-1 Nef protein in the nucleus influences adipogenesis as well as viral transcription through the peroxisome proliferator-activated receptors. *AIDS* 2004; 18:189-198.
86. Gougeon M-L, Pénicaud L, Fromenty B, *et al.* Adipocytes targets and actors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy and metabolic alterations. *Antivir Ther* 2004; 9:161-177.
87. Lubomirov R, Telenti A, Rotger M. Conceptos generales y métodos de estudio en farmacogenética. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26,Supl 6:4-9.
88. Tarr PE, Telenti A. Toxicogenetics of antiretroviral therapy: genetic factors that contribute to metabolic complications. *Antivir Ther* 2007; 12:999-1013.
89. Arnedo M, Taffé P, Sahli R, *et al.* Contribution of 20 single nucleotide polymorphism of 13 genes to dyslipidemia associated with antiretroviral therapy. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17:755-764.
90. Welcome Trust Case Control Consortium: Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447:661-678.
91. Fellay J, Shianna KV, Ge D, *et al.* A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* 2007; 317:944-947.
92. Maher B, Alfírevic A, Vilar FJ, *et al.* TNF- α promoter region gene polymorphisms in HIV-positive patients with lipodystrophy. *AIDS* 2002; 16:2013-2018

93. Nolan D, Moore C, Castley A, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha gene -238G/A promoter polymorphism associated with a more rapid onset of lipodystrophy. *AIDS* 2003; 17:121-122.
94. Tarr PE, Taffé P, Bleiber G, *et al.* Modeling the influence of APOC3, APOE and TNF polymorphisms on the risk of antiretroviral therapy-associated lipid disorders. *J Infect Dis* 2005; 191:1419-26.
95. Zanone Poma B, Riva A, Nasi M, *et al.* Genetic polymorphisms differently influencing the emergence of atrophy and fat accumulation in HIV-related lipodystrophy. *AIDS* 2008; 22:1769-1778.
96. Vonkeman HE, Napel C, Oeveren-Dybicz AM, *et al.* β 3-Adrenergic receptor polymorphism and the antiretroviral therapy-related lipodystrophy syndrome. *AIDS* 2000; 14:1463-1464.
97. Asensi V, Rego C, Montes H, *et al.* IL-1 β (-3954C/T) polymorphism could protect human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients on highly active antiretroviral treatment (HAART) against lipodystrophic syndrome. *Genet Med* 2008; 10:215-223
98. Chiappini F, Teicher E, Saffroy R, *et al.* Relationship between polymerase gamma (POLG) polymorphisms and antiretroviral therapy-induced lipodystrophy in HIV-1 infected patients : a case-control study. *Curr HIV Res* 2009; 7:244-253.
99. Tarr PE, Rotger M, Telenti A. Dyslipidemia in HIV-infected individuals: from pharmacogenetics to pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2010; 11:587-594.
100. Rotger M, Bayard C, Taffé P, *et al.* Contribution of genome-wide significant single-nucleotide polymorphisms and antiretroviral therapy to dyslipidemia in HIV-infected individuals: a longitudinal study. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2:621-628.
101. Shrestha S, Irvin MR, Taylor KD. A genome-wide association study of carotid atherosclerosis in HIV-infected men. *AIDS* 2010; 24:583-592.
102. Martin AM, Hammond E, Nolan D, *et al.* Accumulation of mitochondrial DNA mutations in human immunodeficiency virus-infected patients treated with nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors. *Am J Hum Genet* 2003; 72:549-560.

103. Hendrickson SL, Kingsley LA, Ruíz-Pesini E, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups influence lipoatrophy after highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 51:111-116.
104. Nasi M, Guaraldi G, Orlando G, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups and highly active antiretroviral therapy-related lipodystrophy. *Clin Infect Dis* 2008; 47:962-968.
105. Foulkes AS, Wohl DA, Frank I, *et al.* Associations among race/ethnicity, ApoC-III genotypes, and lipids in HIV-1-infected individuals on antiretroviral therapy. *PLoS Med* 2006;3:e52
106. Bonnet E, Bernard J, Fauvel J, *et al.* Association of APOC3 polymorphisms with both dyslipidemia and lipoatrophy in HAART-receiving patients. *AIDS Res Hum Retrov* 2008; 24:169-171.
107. Guardiola M, Ferré R, Salazar J, *et al.* Protease inhibitor-associated dyslipidemia in HIV-infected patients is strongly influenced by the APOA5-1131T/C gene variation. *Clin Chem* 2006; 52:1914-1919.
108. Alonso-Villaverde, Coll B, Gómez F, *et al.* The efavirenz-induced increase in HDL-cholesterol is influenced by the multidrug resistance gene 1 C3435T polymorphism. *AIDS* 2005; 19:341-350.
109. Yang A, King MS, Han L, *et al.* Lack of correlation between SREBP1 genotype and hyperlipidemia in individuals treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2003; 17:2142-2143.
110. Ranade K, Geese WJ, Noor M, *et al.* Genetic analysis implicates resistin in HIV lipodystrophy. *AIDS* 2008; 22:1561-1568.
111. Domingo P, Baiget M, Arroyo JA, *et al.* Absence of mutations in exon 8 of the *LMNA* gene in combination antiretroviral therapy-associated partial lipodystrophy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 30:457-8.
112. Wangsomboonsiri W, Mahasirimongkol S, Chantarangsu S, *et al.* Association between HLA-B*4001 and lipodystrophy among HIV-infected patients from Thailand who received a stavudine-containing antiretroviral regimen. *Clin Infect Dis* 2010; 50:597-604.

113. Reue K, Dwyer JR. Lipin proteins and metabolic homeostasis. *J Lipid Res* 2009; 50:S109-S114.
114. Donkor J, Sparks LM, Xie H, *et al.* Adipose tissue Lipin-1 expression is correlated with Peroxisome proliferator-activated receptor α gene expression and insulin sensitivity in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:233-239
115. Finck BN, Gropler MC, Chen Z, *et al.* Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 α /PPAR α regulatory pathway. *Cell Metab* 2006; 4:199-210
116. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 86:2548-2556.
117. Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, *et al.* How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2009; 102:515-522.
118. Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, *et al.* Long-term Interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS Med* 2008; 5:600-610.
119. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102:1369-1376.
120. Cardellini M, Perego L, D'Adamo M, *et al.* C-174G polymorphism in the promoter of the interleukin-6 gene is associated with insulin resistance. *Diabetes Care* 2005; 28:2007-2012.
121. Hamid Y H, Rose C S, Urhammer S A, *et al.* Variations of the interleukin-6 promoter are associated with features of the metabolic syndrome in Caucasian Danes. *Diabetologia* 2005; 48:251-260.
122. Kubaszek A, Pihlajamaki J, Komarovski V, *et al.* Promoter polymorphism of the TNF-alpha (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: The Finish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* 2003; 52:1872-1876.
123. Berthier MT, Paradis AM, Tehernof A, *et al.* The interleukin 6 -174G/C polymorphism is associated with indices of obesity in men. *J Hum Genet* 2003; 48:14-19.

124. Wernstedt I, Eriksson AL, Berndtsson A, *et al.* A common polymorphism in the interleukin-6 gene promoter is associated with overweight. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28:1272-1279.
125. Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, *et al.* PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation?. *J Intern Med* 2007; 262:184-198.
126. Caron M, Vigouroux C, Bastard JP, Capeau J. Antiretroviral-related adipocyte dysfunction and lipodystrophy in HIV-infected patients: alteration of the PPAR γ -dependent pathways. *PPAR Res* 2009; 2009:507141
127. Sutinen J. The effects of Thiazolidinediones on metabolic complications and Lipodystrophy in HIV-infected patients. *PPAR Res* 2009; 2009:373524
128. Giralt M, Domingo P, Villarroya F. HIV-1 infection and the PPAR γ -dependent control of adipose tissue physiology. *PPAR Res* 2009; 2009:607902.
129. Meirhaeghe A, Amouyel P. Impact of genetic variation of PPAR γ in humans. *Mol Genet Metab* 2004; 83:93-102.
130. Gouda HN, Sahoo GS, Harding A-H, *et al.* The association between the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 (*PPARG2*) Pro12Ala gene variant and type 2 diabetes mellitus: A HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2010; 171:645-655.
131. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, *et al.* A Pro12Ala substitution in PPAR- γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 1998; 20:284-287.
132. Buzzetti R, Petrone A, Ribaudo MC, *et al.* The common PPAR- γ 2 Pro12Ala variant is associated with greater insulin sensitivity. *Eur J Hum Genet* 2004; 12:1050-1054.
133. Stumvoll M, Häring H. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ 2 Pro12Ala Polymorphism. *Diabetes* 2002; 51:2341-2347.
134. Horiki M, Ikegami H, Fujisawa T, *et al.* Association of Pro12Ala polymorphism of PPAR γ gene with insulin resistance and related diseases. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 66:S63-S67.

135. Meirhaeghe A, Cotel D, Amouyel P, *et al.* Association between peroxisome proliferator-activated receptor γ haplotypes and the metabolic syndrome in French men and women. *Diabetes* 2005; 54:3043-3048.
136. Evangelisti L, Attanasio M, Lucarini L, *et al.* PPAR γ promoter polymorphisms and acute coronary syndrome. *Atherosclerosis* 2009; 205:186-191.
137. Semple RK, Chatterjee VKK, O'Rahilly S. PPAR γ and human metabolic disease. *J Clin Invest* 2006; 116:581-589.
138. Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, *et al.* Lipin expression is attenuated in adipose tissue of insulin-resistant human subjects and increases with peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *Diabetes* 2006; 55:2811-2818.
139. Han GS, Wu WI, Carman GM. The *Saccharomyces cerevisiae* lipin homolog is a Mg²⁺ dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J Biol Chem* 2006; 281:9210-9218.
140. Behrens G, Dejam A, Schmidt H, *et al.* Impaired glucose tolerance, beta cell function and lipid metabolism in HIV patients under treatment with protease inhibitors. *AIDS* 1999; 13:F63-F70
141. Price P, Morahan G, Huang D, *et al.* Polymorphism in cytokine genes define subpopulations of HIV-1 patients who experienced immune restoration diseases. *AIDS* 2002; 16:2043-2047.
142. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 2006; 8:1-6.
143. Foster CB, Lehrnbecher T, Samuels S, *et al.* An IL-6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus. *Blood* 2000; 96:2562-2567.
144. Fernandez S, Rosenow AA, James IR, *et al.* Recovery of CD4⁺ T cells in HIV patients with a stable virologic response to antiretroviral therapy is associated with polymorphisms of interleukin-6 and central major histocompatibility complex genes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41:1-5.

145. Breen EC, Rezai AR, Nakajima K, *et al.* Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production. *J Immunol* 1990; 144:480-484.
146. Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, *et al.* Impact of the peroxisome proliferator activated receptor γ 2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Intern J Obes* 2000; 24:195-199.
147. Zietz B, Barth N, Spiegel D, *et al.* Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPARgamma2) is associated with higher levels of total cholesterol and LDL-cholesterol in male Caucasian type 2 diabetes patients. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2002; 110:60-62.
148. Hamada T, Kotani K, Tsuzaki K, *et al.* Association of Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator receptor gamma2 gene with small dense low-density lipoprotein in the general population. *Metabolism* 2007; 56:1345-1349.
149. Gouda HN, Sagoo GS, Harding A-H, *et al.* The association between the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 (PPARG2) Pro12Ala gene variant and type2 diabetes mellitus: a Huge review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2010; 171:645-655.