

**EFFECTES DE LA INFECCIÓ PEL VIH I DELS FÀRMACS
ANTIRETROVIRALS ENVERS EL MITOCONDRI: LES
CÈL·LULES MONONUCLEARS DE SANG PERIFÈRICA
COM A MODEL D'ESTUDI**

SÒNIA LÓPEZ MORENO

Tesi Doctoral

6. DISCUSSIÓ GLOBAL

La present Tesi Doctoral comprén vuit estudis científics que investiguen la genètica i el funcionalisme mitocondrial en les CMSP de diferents grups de pacients infectats pel VIH. L'objecte d'aquests estudis radica bàsicament en determinar els efectes tòxics que els fàrmacs antiretrovirals (ARVs) i la pròpia infecció pel VIH poden exercir *in vivo* sobre els mitocondris d'aquest tipus cel·lular en particular. En la realització de tots els estudis han participat més de 250 individus. De cada un d'ells hem recopilat dades demogràfiques, epidemiològiques i clíniques, i en global hem determinat un total de 14 paràmetres mitocondrials diferents, mitjançant l'aplicació de tècniques moleculars, bioquímiques i immunohistoquímiques, la qual cosa permet avaluar la biologia mitocondrial en el seu conjunt. A la part introductòria d'aquesta Tesi hem volgut plasmar la capacitat destructora del VIH, principalment envers les cèl·lules del sistema immunològic, i la capacitat supressora dels fàrmacs ARVs envers el VIH. Igualment, hem volgut deixar palesa la importància de la biologia mitocondrial per a la viabilitat de qualsevol tipus cel·lular amb metabolisme oxidatiu, i el significat i la repercussió clínica que una alteració mitocondrial pot suposar a l'organisme humà. La interacció d'aquests tres factors (VIH, ARVs i mitocondris) pot comprometre la funció mitocondrial i magnificar la susceptibilitat d'aquests orgànuls generadors d'energia a patir qualsevol tipus d'alteració que, en últim terme, es pot manifestar clínicament. El nostre grup va ser pioner en aportar dades de disfunció mitocondrial *in vivo* en una pacient infectada pel VIH que rebia TARGA i que manifestava símptomes clínics de LD. La pacient presentava deleccions múltiples de l'ADNmt al múscul esquelètic i teixit adipós subcutani, juntament amb disminució de l'activitat oxidativa mitocondrial i de l'activitat enzimàtica del C III i C IV de la CTE, al múscul i a les CMSP. A més, l'estudi histològic de les fibres musculars va revelar la presència d'inclusions lipídiques a l'interior dels miòcits, indicatives d'alteració mitocondrial (Miró Ò, AIDS 2000). Aquest treball va recolzar la hipòtesi sobre la implicació mitocondrial en el desenvolupament de la LD associada al TARGA proposada per K. Brinkman i col·laboradors (Brinkman K, Lancet 1999). Poc després, l'estudi es va ampliar a 7 pacients infectats pel VIH amb LD i demostrà alteracions mitocondrials al múscul esquelètic, equivalents a les trobades al primer estudi (Gómez-Zaera M, AIDS 2001). Els resultats observats, van suggerir que els pacients amb LD associada al TARGA presenten una alteració mitocondrial extensa que pot jugar un paper central en la seva fisiopatologia. Aquests estudis han marcat el camí a seguir en l'elaboració de les hipòtesis plantejades en aquesta Tesi.

Els diversos treballs que conformen la Tesi es poden segmentar en dos blocs principals segons el tipus de pacients infectats pel VIH en estudi, i l'últim bloc es pot subdividir en dos segons sigui l'efecte que estiguem avaluant sobre els mitocondris de les CMSP dels pacients infectats pel virus:

A. Estudis en pacients infectats pel VIH simptomàtics respecte a la síndrome de LD associada al TARGA.

B. Estudis en pacients infectats pel VIH asimptomàtics respecte a qualsevol efecte secundari greu associat al TARGA.

B.1. Efecte de la pròpia infecció pel VIH.

B.2. Efecte dels ARVs.

A. Estudis en pacients infectats pel VIH simptomàtics respecte a la síndrome de LD associada al TARGA.

En el moment d'iniciar els treballs d'aquesta Tesi, els estudis mitocondrials realitzats en pacients infectats pel VIH afectes de LD eren escasos, un tant discrepants, i molt pobres en quant a anàlisi de la morfologia i funció mitocondrial. A més, la hipòtesi de la toxicitat mitocondrial dels anàlegs de nucleòsid (ITIAN) com a principal responsable del desenvolupament de la LD en aquests pacients encara no estava totalment consolidada (Moyle G, AIDS 2001).

Davant els resultats previs obtinguts pel nostre grup en pro de la hipòtesi de toxicitat mitocondrial (Miró Ò, AIDS 2000) (Gómez-Zaera M, AIDS 2001) vàrem elaborar una carta dirigida a l'editor de la revista Medicina Clínica, a través de la qual vam voler transmetre la idea de que en l'etiopatogènia de la síndrome de LD com a efecte secundari associat al TARGA es pot veure implicada de manera important una disfunció mitocondrial.

Fins aquell moment, la disfunció mitocondrial present al múscul esquelètic dels pacients VIH positius amb LD associada al TARGA havia quedat demostrada. Certament, el teixit muscular és considerat un teixit diana de les alteracions mitocondrials en les miopaties clàssiques, i en el cas de la LD associada als ARVs el teixit diana vindria representat pel teixit adipós. Però, l'estudi d'aquests teixits és molt laboriós, ja que implica la realització d'una biòpsia. En aquest context, vam pensar en la possibilitat de reproduir l'estudi mitocondrial en un material biològic de més fàcil obtenció, com les CMSP. Les CMSP comporten menys dificultat a l'hora de realitzar els estudis i representen una font de material biològic ideal per a la realització d'estudis longitudinals. Tot i que les CMSP no representen *a priori* un teixit diana preferencial de les alteracions mitocondrials en aquests pacients, s'ha demostrat que moltes malalties mitocondrials clàssiques són detectables tant en múscul esquelètic com en CMSP (Rotig A, J Clin Invest 1990) (Rotig A, J Clin Invest 1993) (Burgeois M, Brain Dev 1992) (Rotig A, Am J Hum Genet 1992). A més, donat que la incorporació dels fàrmacs ARVs a l'interior de les cèl·lules no va dirigida a un tipus cel·lular en concret i donat que totes les cèl·lules del nostre

organisme (a excepció del eritròcits) contenen mitocondris, qualsevol cèl·lula del nostre organisme és susceptible de patir els efectes tòxics dels ARVs. Ara bé, la major o menor sensibilitat dependrà del tipus cel·lular i dels fàrmacs administrats. Així, l'objectiu del segon treball va ser demostrar que les alteracions mitocondrials que s'havien detectat prèviament al múscul esquelètic dels pacients VIH positius amb LD associada al TARGA (alteracions genètiques i deficiències enzimàtiques dels complexos proteics de la CTE del sistema OXPHOS) es detecten igualment en les CMSP. També, pretén determinar si una hipotètica depleció de l'ADNmt en les CMSP d'aquests pacients repercuteix negativament en la funció del sistema OXPHOS. Els resultats obtinguts indiquen que els pacients infectats pel VIH amb LD tenen disminuït el contingut d'ADNmt de les CMSP respecte als pacients VIH positius que mai han rebut ARVs. Aquesta depleció del genoma mitocondrial pot ser deguda, tal i com s'ha demostrat en diferents estudis realitzats *in vitro* (Lim SE, Journal of Biological Chemistry 2001) (Chen CH, J Biol Chem 1989) (Kakuda T, Clin Ther 2000) (Chen CH, Mol Pharmacol 1991), a la capacitat que tenen els ITIAN d'inhibir l'ADNpol- γ , l'únic enzim responsable de la replicació del genoma mitocondrial i, en menor mesura, de la seva reparació. El 46% de depleció d'ADNmt (respecte als individus VIH positius que mai han rebut ARVs), suggereix que la disminució del contingut del genoma mitocondrial podria estar implicada directament en el desenvolupament de la LD associada al TARGA. Aquest resultat concorda amb els dos estudis previs realitzats pel nostre grup al múscul esquelètic de pacients amb LD en els que l'ADNmt també estava alterat, amb la presència de delecions múltiples (Miró Ò, AIDS 2000) (Gómez-Zaera M, AIDS 2001). Igualment, altres grups d'investigació han demostrat disminució del contingut d'ADNmt i/o delecions al teixit adipós (Shikuma CM, AIDS 2001) (Walker UA, JAIDS 2002), al múscul esquelètic i al fetge (Vittecoq D, JAIDS 2002) de pacients afectes de LD, i coincideixen en relacionar aquestes alteracions genètiques amb l'aparició de la síndrome de redistribució de greix corporal. Altres estudis no han determinat específicament el contingut d'ADNmt, però sí apunten a un increment de l'apoptosi (procés de mort cel·lular programada on els mitocondris tenen una funció clau en el seu desencadenament) del teixit adipós subcutani en pacients afectes de LD (Domingo P, AIDS 1999).

Respecte a la utilitat de les CMSP en la detecció d'alteracions mitocondrials en pacients infectats pel VIH, val a dir que en aquell temps s'havien realitzat pocs estudis mitocondrials en aquest tipus cel·lular. La majoria dels estudis presentaven únicament dades moleculars sobre l'ADNmt, però l'anàlisi de la funció mitocondrial no s'havia realitzat en la majoria dels casos, amb la qual cosa no podien avaluar la repercussió funcional de les alteracions moleculars detectades. Els resultats dels diferents grups eren un tant contradictoris, la qual cosa havia generat certa controvèrsia respecte el valor de les CMSP com a model d'estudi de les alteracions mitocondrials en els pacients amb LD. Concretament, el grup de G. Mc Comsey

estudià 10 pacients VIH positius en TARGA i afectes de LD en els que l'anàlisi del genoma mitocondrial de les CMSP va resultar normal i els estudis de la funció mitocondrial no es van realitzar (Mc Comsey G, AIDS 2002). L'estudi portat a terme pel Professor A. Cossarizza i col·laboradors incloïa 6 pacients VIH positius en TARGA afectes de LD en els que van determinar la funció mitocondrial de les CMSP mitjançant la mesura del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_{mt}$), així com el procés apoptòtic i possibles canvis en la distribució del lípid cardiolipina en la membrana mitocondrial. Aquest estudi no va revelar cap alteració en cap dels paràmetres estudiats i no va demostrar l'existència de depleció de l'ADNmt (Cossarizza A, J Inf Diseases 2002). Posteriorment, el grup de D. Vittecoq i col·laboradors va estudiar les CMSP de 12 pacients infectats pel VIH en TARGA afectes de LD. Van determinar uns valors normals de les activitats enzimàtiques dels C III i IV de la CTE, però van trobar disminució del contingut mitocondrial, mesurat a través de l'activitat enzimàtica de l'enzim citrat sintasa, en alguns dels pacients estudiats. A nivell molecular, no van detectar depleció del contingut d'ADNmt (Vittecoq D, JAIDS 2002). Pel contrari, el grup de H. Côté va estudiar les CMSP de 8 pacients VIH positius en TARGA afectes d'hiperlactatèmia (un altre efecte secundari dels ARVs al que s'atribueix una disfunció mitocondrial), i van detectar depleció de l'ADNmt durant l'administració del TARGA. El contingut d'ADNmt es va restablir un cop discontinuat el tractament ARV. En aquest cas, tampoc es van realitzar estudis de funcionalisme mitocondrial (Côté H, N Engl J Med 2002).

Segons els nostres resultats, la depleció d'ADNmt present en les CMSP dels pacients afectes de LD s'associa amb deficiències en l'activitat enzimàtica dels complexos proteics que estan parcialment codificats pel genoma mitocondrial (C III i C IV), mentre que l'activitat de l'únic complex enzimàtic codificat íntegrament pel nucli (C II) no experimenta cap alteració. Les deficiències enzimàtiques detectades no són suficientment importants com per generar una disminució significativa de la capacitat oxidativa mitocondrial de les CMSP, tot i que hi ha una tendència a disminuir la respiració cel·lular. Probablement, el percentatge d'ADNmt deplecionat no sigui l'únic responsable per explicar les deficiències enzimàtiques detectades, doncs si es compara amb els percentatges de depleció necessaris en moltes miopaties clàssiques per tenir expressió fenotípica, aquests poden arribar a ser tan elevats com un 80-90%. En aquest sentit, no es pot descartar l'efecte negatiu addicional que altres mecanismes, diferents a la inhibició de l'ADNpol- γ per part dels ITIAN, poden exercir sobre el sistema OXPHOS (p.e. efectes negatius envers l'ARNmt, efecte directe dels ARVs sobre els complexos enzimàtics del sistema OXPHOS, increment de radicals lliures generadors d'un ambient hostil que limita l'eficiència enzimàtica, increment dels mecanismes apoptòtics, alteracions en l'estructura de la membrana mitocondrial, alteracions del $\Delta\psi_{mt}$, etc.).

En definitiva, aquest segon treball demostra que certament és possible detectar canvis en els paràmetres genètics i bioquímics mitocondrials en les CMSP, i que per tant aquest tipus cel·lular representa un bon model d'estudi de les alteracions mitocondrials implicades en el desenvolupament de la LD associada al TARGA en els pacients infectats pel VIH.

Les diferències en els resultats obtinguts pels diferents grups d'investigació en les CMSP poden ser atribuïdes principalment a la dificultat d'incloure grups de pacients homogenis en quant a l'historial clínic i terapèutic, a la dificultat d'emetre un diagnòstic clar i objectiu de la síndrome de LD i a la variabilitat en l'ús de tècniques, que presenten major o menor sensibilitat, per a la determinació dels paràmetres mitocondrials moleculars i bioquímics. Amb posterioritat, s'han publicat diferents estudis realitzats en CMSP que, de la mateixa manera que el nostre grup, consideren a aquest tipus cel·lular com un material biològic sensible, fiable i de fàcil obtenció per l'estudi dels paràmetres mitocondrials en els pacients VIH positius. L'estudi longitudinal de Gurlain i col·laboradors va determinar que el contingut d'ADNmt de les CMSP de pacients infectats pel VIH disminuïa després de rebre TARGA de primera línia durant un període de 6 mesos, i que el genoma mitocondrial dels mateixos pacients abans de rebre TARGA estava deplecionat respecte un grup d'individus sans no infectats pel VIH (Gurlain K, HIV Medicine 2003). D'altra banda, M. van der Valk i col·laboradors troben que l'ADNmt de les CMSP de pacients VIH positius amb lipoatròfia associada a l'administració d'ARVs està deplecionat respecte els pacients en tractament ARV que no manifesten cap efecte secundari greu derivat del TARGA (Van der Valk M, Antiviral Therapy 2004). AM. Martin i col·laboradors van realitzar un estudi longitudinal on analitzaven la seqüència i el contingut de l'ADNmt de les CMSP de pacients infectats pel VIH, abans de rebre ARVs i després de 6-77 mesos de rebre TARGA amb ITIAN. Van detectar la presència de mutacions en l'ADNmt en el 31% dels pacients en TARGA, i en el 64% dels pacients el contingut d'ADNmt havia disminuït després de rebre TARGA. A més, el 80% del pacients en tractament ARV que tenien mutacions havien desenvolupat símptomes de lipoatròfia durant l'estudi (Martin AM, Am J Hum Genet 2003). En un altre estudi, R. Polo i col·laboradors, tot i que no investiguen directament el contingut d'ADNmt, quantifiquen la funció mitocondrial *in vivo* mitjançant la determinació del $\Delta\psi_{mt}$. Els autors detecten en els pacients infectats que reben TARGA un increment del percentatge de CMSP que presenten pèrdua del $\Delta\psi_{mt}$, dada que representa un clar indicador de disfunció mitocondrial. A més, els autors observen una major disfunció mitocondrial amb l'administració de d4T o ddI, quan es compara amb la utilització d'AZT (Polo R, J Acquir Immune Defic Syndr 2003). L'estudi de CL. Cherry i col·laboradors analitza el contingut d'ADNmt en les CMSP i teixit subcutani de pacients infectats pel VIH i detecta que aquest està disminuït en ambdós teixits respecte els individus sans no infectats pel virus. A més, aquest estudi associa major disminució del genoma mitocondrial al teixit subcutani, però no a les CMSP, amb l'administració

d'ITIAN (Cherry CL, J Acquir Immune Defic Syndr 2002). Pel contrari, A. Cossarizza i col·laboradors detecten un increment del contingut d'ADNmt en els limfòcits T aïllats de sang perifèrica dels pacients VIH positius amb LD (Cossarizza A, Antiviral Therapy 2003). Argumenten que aquest increment del genoma mitocondrial pot ser el resultat d'un efecte compensatori per part del mitocondri per tal d'assegurar uns nivells cel·lulars adequats d'ATP en un ambient on la immunitat cel·lular està alterada. Hi ha altres estudis que no detecten depleció del contingut d'ADNmt en les CMSP de pacients infectats pel VIH (Henry K, AIDS 2002) (Christensen ER, CID 2004) (Hoy JF, JID 2004). Alguns investigadors assenyalen com a possibles causes d'aquest resultat negatiu el fet que alguns estudis es realitzen amb un nombre de pacients baix, fet que estaria limitant la potència estadística. Una altra possible raó s'atribueix a que probablement les dianes gèniques amplificades en els assajos de PCR aplicats en la quantificació de l'ADNmt no siguin les més adequades. També podria ser que el temps d'exposició als ITIAN no sigui suficientment gran com per a que els ARVs puguin manifestar el seu efecte tòxic o que, pel contrari, el temps d'exposició hagi estat excessiu i s'estigui avaluant el contingut d'ADNmt en el moment en el que la depleció del genoma mitocondrial s'ha estabilitzat i ja no disminueix més. En aquest sentit, els estudis longitudinals assenyalen que la davallada més acusada del genoma mitocondrial té lloc durant els primers mesos de rebre TARGA i que després té lloc una estabilització (Reiss P, HIV Med 2004) (Petit C, J Acquir Immune Defic Syndr 2003).

Per tant, podem concloure que encara hi ha certa discrepància respecte al paper que poden tenir les CMSP en l'estudi dels trastorns mitocondrials dels pacients amb LD, si bé l'experiència del nostre grup és favorable a la utilització d'aquestes cèl·lules sempre que es tinguin en compte les consideracions metodològiques que s'han discutit prèviament.

Així, doncs, hem elaborat una revisió de les hipòtesis més acceptades envers l'etiopatogènia dels efectes secundaris associats al TARGA, principalment la hipòtesi de toxicitat mitocondrial amb la que es relacionen la majoria dels efectes adversos derivats de l'administració dels ITIAN. Igualment, hem discutit abastament les dificultats dels estudis que s'han realitzat fins el moment, i que han limitat l'obtenció de resultats homogenis i conclouents.

B. Estudis en pacients infectats pel VIH asimptomàtics respecte a qualsevol efecte secundari greu associat al TARGA.

B.1. Efecte dels fàrmacs antiretrovirals sobre els mitocondris de les CMSP dels pacients infectats pel VIH

En els estudis del primer bloc de la Tesi s'ha demostrat la presència d'alteracions mitocondrials en les CMSP de pacients VIH positius amb LD. Això ens portà a preguntar-nos si

aquestes alteracions (depleció del contingut d'ADNmt i deficiències enzimàtiques dels complexos proteics de la CTE que estan parcialment codificats pel genoma mitocondrial) poden ser també detectades en les CMSP de pacients asimptomàtics, abans de que es manifesti qualsevol efecte secundari greu derivat de l'administració del TARGA. Igualment, vam voler determinar si les alteracions mitocondrials que hipotèticament es detecten en les CMSP de manera precoç venen acompanyades d'alteracions en la funció mitocondrial. De forma addicional, vam avaluar en una fase asimptomàtica la intensitat del dany mitocondrial de les diverses combinacions TARGA més utilitzades en la pràctica clínica per tal d'establir una gradació de toxicitat entre elles. Per l'estudi mitocondrial de les CMSP en pacients asimptomàtics vam incloure dos grups d'individus infectats pel VIH que havien rebut diferents esquemes TARGA de primera línia durant un període mínim de 6 mesos, i els vàrem comparar amb un grup control, representat per pacients infectats que mai havien rebut ARVs. Els pacients en tractament ARV de primera línia s'agrupaven segons rebien la combinació d'ITIAN d4T+ddl o AZT+3TC, més un tercer fàrmac que podia ser el no anàleg de nucleòsid (ITINAN) nevirapina (NVP) o l'inhibidor de la proteasa (IP) nelfinavir (NFV). Aquests esquemes TARGA representen quatre de les combinacions farmacològiques més utilitzades en la pràctica clínica diària en el moment de la realització de l'estudi (d4T+ddl+NVP, d4T+ddl+NFV, AZT+3TC+NVP i AZT+3TC+NFV). Els resultats obtinguts indiquen que els pacients infectats pel VIH que reben la combinació d4T+ddl de forma continuada tenen disminuït el contingut d'ADNmt de les CMSP un 44% respecte als pacients VIH positius que mai han rebut ARVs. En canvi, els pacients que reben AZT+3TC presenten el contingut d'ADNmt preservat, al menys durant els primers 6 mesos de tractament continuat. El diferent grau de toxicitat mitocondrial, envers el contingut del genoma mitocondrial, que exhibeixen les combinacions ARVs avaluades en aquest estudi, concorda amb treballs realitzats *in vitro* que consideren l'AZT i el 3TC dos dels ITIAN amb menor capacitat per inhibir l'ADNpol- γ (Birkus G, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002) (Lim SE, Journal of Biological Chemistry 2001). L'estudi de SE Lim i col·laboradors (Lim SE, Journal of Biological Chemistry 2001), estableix una jerarquia de toxicitat mitocondrial (ddC>ddl>d4T>>>AZT>3TC>ABV=TDF) en la que els ITIAN ddC, ddl i d4T representen els ARVs amb major capacitat d'aturar la replicació del genoma mitocondrial. Aquesta capacitat ve determinada per l'afinitat del fàrmac per unir-se a l'ADNpol- γ i incorporar-se a la cadena d'ADNmt naixent, i per l'habilitat de l'ADNpol- γ d'escindir l'ITIAN de la cadena d'ADNmt que s'està polimeritzant. Una altra dada rellevant d'aquest estudi consisteix en que la depleció d'ADNmt que exhibeixen els pacients inclosos en l'estudi que reben d4T+ddl es presenta associada a una lleugera disminució de l'activitat enzimàtica específica del C IV quan es compara amb els individus infectats pel VIH que mai han rebut TARGA. Els pacients que no exhibeixen depleció d'ADNmt, presenten inalterada l'activitat d'aquest complex enzimàtic

parcialment codificat pel genoma mitocondrial. D'altra banda, tots els pacients que reben tractament ARV presenten disminuït el contingut de mitocondris respecte els pacients infectats pel virus que mai han rebut ARVs, amb independència de la combinació d'ARVs que reben. Finalment, s'ha de remarcar que l'activitat oxidativa mitocondrial de les CMSP dels pacients en TARGA de primera línia no està alterada i el grau de peroxidació lipídica no es mostra incrementat en cap dels grups de tractament.

Aquest estudi va constituir un dels primers treballs en investigar la biologia mitocondrial des d'un punt de vista genètic i funcional en un grup de pacients infectats pel VIH en tractament però asimptomàtics. Cal destacar que aquest estudi inclou un nombre important de pacients que són estrictament homogenis en relació a la teràpia ARV que reben. A més, cada un dels pacients en tractament contra el VIH rebia un esquema TARGA de primera línia, la qual cosa ha proporcionat una validesa addicional a l'estudi, doncs assegura l'avaluació dels efectes tòxics d'una pauta ARV concreta, sense que puguin interferir en els resultats les dosis acumulades d'altres possibles combinacions ARVs administrades amb anterioritat. En definitiva, l'estudi demostra l'existència de diferents patrons de toxicitat associats a diferents pautes ARVs, ja sigui en forma de depleció d'ADNmt i disminució de l'activitat enzimàtica del C IV de la CTE en relació a l'administració de d4T+ddl, o ja sigui en forma de disminució del contingut mitocondrial associat a tots els esquemes TARGA avaluats en l'estudi.

H. Côté i col·laboradors, havien proposat en un treball realitzat en CMSP de pacients infectats pel VIH en TARGA afectes d'hiperlactatèmia, que la quantificació de l'ADNmt fós utilitzada com a marcador de toxicitat mitocondrial (Côté H, N Engl J Med 2002). Els autors d'aquest estudi argumentaren que la monitorització del contingut de l'ADNmt podria ajudar a prevenir de forma precoç la manifestació clínica dels efectes adversos associats al TARGA, com la LD i la hiperlactatèmia o acidosi làctica. En canvi, davant els nostres resultats considerem que no s'ha d'atribuir directament un efecte patogènic a qualsevol disminució del contingut del genoma mitocondrial mentre la funció dels mitocondris sigui normal (Casademont J, N Engl J Med 2002). En aquest sentit, el nostre treball destaca especialment la importància de valorar la repercussió de la depleció d'ADNmt sobre la funció mitocondrial mitjançant un estudi simultani genètic i funcional dels mitocondris. Altres estudis també van demostrar la presència d'alteracions del genoma mitocondrial en pacients asimptomàtics en tractament ARV (White DJ, AIDS 2001) (Diehl S, AIDS 2003) (Mital, AIDS 2004), en concret, que el d4T causa una major depleció de l'ADNmt que la resta d'ARVs i que la seva administració incrementa el risc de desenvolupar LD (Van der Valk M, Antiviral Therapy 2004) (Walker UA, AIDS 2002) (Nolan D, Antiviral Therapy 2003) (John M, Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes 2003) (Nolan D, AIDS 2003) (Smith DE, AIDS 2002) (Galli M, Arch Intern Med 2002) (Saint-Marc T, AIDS 1999) (Mallal SA, AIDS 2000), tal i com suggerien

estudis realitzats *in vitro* (Birkus G, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002) (Lim SE, Journal of Biological Chemistry 2001).

Els darrers anys ha augmentat el nombre de noves combinacions d'ARVs amb gran activitat anti-VIH, tot cercant disminuir els seus efectes secundaris. D'aquesta manera, hem volgut contribuir a l'estudi dels efectes d'altres combinacions TARGA administrades en l'actualitat sobre els mitocondris de les CMSP de pacients VIH positius asimptomàtics. Així, es presenta en aquest bloc un segon treball, on es porta a terme un estudi longitudinal realitzat durant un període de 12 mesos, en el què s'avalua l'efecte de l'addició de TDF en dosi de 300 mg en una combinació TARGA que conté ddl en dosi de 400 mg. El TDF és un fàrmac del tenofovir, el qual representa l'únic anàleg de nucleòtid (ITIANt) avui dia disponible contra la infecció pel VIH. Estudis *in vitro* han determinat que el TDF té baixa afinitat per l'ADNpol- γ , en comparació amb els ITIAN ddC, ddl, d4T, AZT, 3TC, etc., amb la qual cosa s'espera que la seva administració de forma continuada produeixi un efecte tòxic mitocondrial baix (Birkus G, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002) (Cherrington JM, Antivir Chem Chemother 1995) (Cihlar T, Antivir Res 2002) (Cihlar T, Antivir Chem Chemother 1997). Per contra, recentment s'ha descrit que l'administració concomitant de ddl (400 mg) i TDF (300 mg), produeix un efecte sinèrgic, de manera que la concentració plasmàtica de ddl augmenta considerablement. En conseqüència, la combinació ddl+TDF podria contribuir a l'increment dels efectes tòxics mitocondrials directament associats a l'administració de ddl. Per a la realització d'aquest estudi vam incloure pacients infectats pel VIH asimptomàtics respecte a la infecció pel VIH i a la teràpia ARV, que rebien ddl en la combinació TARGA. En el moment de la inclusió a l'estudi els vam dividir en dos grups comparables en quant a la teràpia ARV, de forma que un d'ells continuaria durant els 12 mesos de l'estudi amb la mateixa combinació inicial d'ARVs amb ddl, i l'altre grup canviaria a un nou esquema farmacològic que mantindria el ddl, però inclouria TDF i NVP. Als 6 mesos d'estudi vam observar que ambdós grups experimenten una lleugera disminució del contingut d'ADNmt (22% de disminució significativa pel grup en ddl+TDF *versus* 11% de disminució no significativa pel grup control), mentres que la quantitat de mitocondris i l'activitat enzimàtica del C IV no es veuen afectades. La disminució del nombre de molècules d'ADNmt que es detecta durant els primers mesos de l'estudi, pot respondre a la capacitat descrita pel ddl d'inhibir l'ADNpol- γ . L'efecte tòxic produït en aquest moment de l'estudi no és de suficient magnitud com per a generar danys funcionals. Als 12 mesos, els resultats mostren que els dos grups exhibeixen una depleció de l'ADNmt més acusada respecte als valors inicials, però la disminució és més dràstica i significativa únicament en el grup de pacients que rep ddl+TDF (55% de disminució pel grup en ddl+TDF *versus* 19% de disminució pel grup control). Aquest resultat, probablement estigui reflectint l'efecte sinèrgic del ddl i el TDF que es produeix quan els dos fàrmacs s'administren en combinació. En aquest cas,

l'addició de TDF estaria incrementant la concentració plasmàtica del ddl i, en conseqüència, els efectes tòxics associats al ddl estarien potenciats. En aquest moment de l'estudi, el 55% de depleció que exhibeixen els pacients que reben TDF implica alteració de la funció mitocondrial en termes de disminució significativa del contingut mitocondrial i de l'activitat enzimàtica del C IV de la CTE (28% i 47% de disminució, respectivament). En canvi, la depleció (més discreta) que exhibeixen els pacients que no reben TDF no és suficientment important com per a generar disfunció mitocondrial. De forma addicional, hem observat que, en el grup de pacients que reben ddl+TDF, l'evolució dels paràmetres mitocondrials avaluats al llarg del temps no depèn de la combinació ARV que els pacients rebien a l'inici de l'estudi, que podia ser ddl+d4T o bé ddl+altres ARVs.

En definitiva, aquest treball constitueix uns dels primers estudis que avalua *in vivo* els efectes tòxics mitocondrials de la combinació d'ARVs ddl+TDF i permet concloure que la combinació TARGA que inclou ddl de 400 mg i TDF de 300 mg produeix un efecte tòxic mitocondrial superior a l'efecte que produeix una pauta ARV que inclou ddl de 400 mg sense TDF. Aquest major dany mitocondrial podria ser la base d'alguns efectes adversos observats en pacients que reben aquesta combinació (Martínez E, Lancet 2004) (Barrios A, AIDS 2004) (Moyle G, Program and abstracts of the 44th Annual ICAAC Meeting; October 30-November 2, 2004; Washington, DC. Abstract H-566.) (Podzamczar D, Antivir Ther 2004) (Maitland D, AIDS 2005) (Negredo E, AIDS 2004) (Barrios A, AIDS 2005) (Tung MY, HIV Med 2005).

Com hem pogut veure fins ara, la disminució del contingut d'ADNmt no sempre s'acompanya d'alteració funcional. Per tant, s'intueix l'existència de mecanismes compensatoris durant les fases inicials del tractament. Per elucidar aquesta qüestió, hem realitzat un estudi en CMSP de pacients VIH positius que reben TARGA de primera línia amb d4T i ddl i que estan assintomàtics. Els resultats obtinguts mostren que existeix disminució del contingut d'ADNmt respecte a pacients infectats pel virus que mai han rebut ARVs. En canvi, l'expressió proteica de la subunitat II del C IV mitocondrial (COX-II) i l'activitat enzimàtica del C IV es mantenen normals. D'altra banda, el contingut de mitocondris es presenta disminuït en el grup de pacients en tractament. Addicionalment, l'estudi mostra una estreta associació inversa entre el contingut d'ADNmt i el temps que porten rebent TARGA, i una certa tendència a disminuir l'expressió proteica de la subunitat COX-II amb l'increment de temps en TARGA. Aquest fet, no descarta la possibilitat de detectar deficiències proteiques en pacients infectats pel virus amb un historial terapèutic més ampli. A més, en el grup de pacients que no reben ARVs es relaciona una disminució de la COX-II amb l'augment de la càrrega viral i la disminució de limfòcits T CD4⁺, la qual cosa indica que l'estat virològic i immunològic del pacient pot afectar a l'expressió de la COX-II, amb independència de la teràpia ARV.

En resum, aquests resultats mostren que malgrat la deficiència genètica detectada als mitocondris, l'expressió proteica de la subunitat de codificació mitocondrial COX-II i l'activitat del C IV del sistema OXPHOS es mantenen inalterades als pacients en tractament ARV que es troben en una fase subclínica en relació a la infecció pel VIH, almenys en les CMSP i durant els primers 16 mesos de promig en TARGA. Aquest resultat, estaria reflectint la capacitat de compensació funcional que tenen els mitocondris, ja que clàssicament es considera que poden suportar defectes moleculars en més del 80% del genoma mitocondrial (White AJ, Sex Transm Infect 2001). Considerem que durant la fase asimptomàtica, exempta de disfunció mitocondrial, hi hauria mecanismes compensatoris a nivell de transcripció o traducció que contrarrestarien l'existència de deficiències genètiques als mitocondris, que permetrien mantenir dintre de la normalitat els nivells proteics dels complexos enzimàtics de la CTE del sistema OXPHOS. Aquest és un aspecte que sens dubte s'aprofundirà en la seva investigació durant els propers anys.

B.2. Efecte De La Pròpia Infecció Pel VIH Sobre Els Mitocondris De Les CMSP Dels Pacients Infectats Pel VIH

Fins el moment, hem presentat una sèrie de treballs que ens permeten aprofundir en el coneixement de les alteracions mitocondrials que manifesten els pacients que reben TARGA. No obstant, en els estudis que es presenten en aquesta secció de la Tesi s'ha tingut especialment en compte els possibles efectes tòxics que el propi VIH pot exercir sobre els mitocondris. Aquesta consideració es basa en els resultats d'un estudi que va ser pioner en demostrar que el contingut d'ADNmt en CMSP de pacients infectats pel VIH i que mai havien rebut TARGA es trobava molt disminuït respecte el contingut d'ADNmt d'una població control sana no infectada pel virus (Côté H, N Engl J Med 2002). Malauradament, aquest treball no presentava dades sobre la funció mitocondrial en aquests pacients. Per aquest motiu, vàrem dissenyar un estudi per comparar diferents paràmetres mitocondrials en un grup de pacients infectats pel VIH que mai han rebut TARGA i un grup d'individus sans no infectats pel VIH. Els resultats obtinguts mostren que la infecció pel VIH s'associa a un 23% de disminució significativa del contingut d'ADNmt. Igualment, l'activitat enzimàtica del C III i C IV es troba disminuïda de forma significativa (38% i 19% de disminució, respectivament). Donat que el percentatge de depleció del material genètic mitocondrial detectat en el grup de pacients VIH positius és relativament petit com per repercutir negativament sobre la funció mitocondrial, és molt possible que altres mecanismes diferents a la depleció del genoma mitocondrial puguin ser la causa del dany en l'activitat del C III i C IV. D'acord amb aquesta reflexió es troba el fet que l'activitat enzimàtica del C II (que no està codificat per gens mitocondrials) també presenta una disminució del 41% respecte els individus no infectats. Això indicaria que l'afectació produïda pel VIH no es limita únicament a les proteïnes codificades pel mitocondri, sinó també

a les codificades pel nucli. A més, la proteïna glicerol-3-fosfat deshidrogenasa mitocondrial (GDHmt) igualment presenta la seva activitat enzimàtica disminuïda, mostrant que l'efecte tòxic del VIH no tan sols afecta a proteïnes que formen part de la CTE del sistema OXPHOS sinó també a proteïnes que no guarden relació directa amb la maquinària de fosforilació oxidativa. Així mateix, hem detectat que el dany oxidatiu de les CMSP es troba augmentat en el grup de pacients VIH positius respecte els individus sans, probablement com a conseqüència de l'elevat grau de disfunció mitocondrial que exhibeixen els pacients infectats. Per tant, creiem que la infecció pel VIH produeix un efecte tòxic cel·lular generalitzat, que no està exclusivament limitat a la toxicitat mitocondrial. En aquest sentit, treballs posteriors han trobat resultats que concorden amb els nostres, tant en CMSP (Miura T, J Med Virol 2003) (Chiappini F, Lab Invest 2004) (Torre D, Clin Infect Dis 2005) (Torre D, Lancet Infect Dis 2002) (Gourlain K, HIV Medicine 2003) (Martin AM, Am J Hum Genet 2003) (Polo R, J Acquir Immune Defic Syndr 2003) (Cherry CL, J Acquir Immune Defic Syndr 2002), com en teixit adipós subcutani (Cherry CL, J Acquir Immune Defic Syndr 2002). Per tant, avui dia cal considerar com a un fet ben establert aquesta capacitat lesiva mitocondrial del VIH.

Donada l'existència d'aquest dany mitocondrial generalitzat, és probable que l'activació de mecanismes apoptòtics per part del VIH tinguin relació amb les alteracions trobades. De fet, és ben conegut que diferents proteïnes virals poden activar l'apoptosi (Vpr, Env, Nef, Tat, proteasa, gp120) per diferents mecanismes. L'apoptosi, com a possible nexa d'unió entre el VIH i els efectes tòxics mitocondrials que es generen durant la infecció, amb independència del TARGA, constitueix actualment una de les teories més recolzades, que estan essent objecte d'intensa investigació. En aquest sentit, es presenta en aquest segon bloc de la Tesi un cinquè estudi que avalua en pacients infectats pel VIH que mai han rebut ARVs si el grau d'apoptosi es veu incrementat per efecte directe del VIH en comparació amb els individus sans no infectats. De forma addicional, hem inclòs pacients asimptomàtics infectats pel VIH que reben TARGA i pacients que han desenvolupat LD associada a l'administració continuada dels ARVs. D'aquesta forma, determinarem si el grau d'apoptosi es veu incrementat de forma addicional per efecte del TARGA, i si es veu encara més incrementat en els pacients simptomàtics, donant a entendre que l'apoptosi (relacionada amb la disfunció mitocondrial) pot estar implicada en el desenvolupament dels efectes secundaris greus derivats de la teràpia ARV. L'estudi l'hem realitzat en múscul esquelètic, doncs en el moment de desenvolupar l'estudi ja disposàvem de teixit muscular criopreservat a -80°C, i donat que les alteracions mitocondrials són més evidents en teixits postmitòtics, que tenen una gran dependència de la fosforilació oxidativa, vàrem pensar que seria un teixit adequat per detectar diferències en el grau d'apoptosi entre els grups d'estudi. D'altra banda, la tècnica metodològica que, en el moment de realitzar l'estudi teníem implementada al nostre laboratori estava específicament dirigida a l'estudi sobre teixit *in*

situ, i no sobre cèl·lules aïllades. Els resultats obtinguts mostren un clar increment de l'apoptosi en el múscul esquelètic del grup de pacients infectats pel VIH que no reben TARGA en comparació amb el grup d'individus sans no infectats pel virus. D'altra banda, la resta de grups estudiats presenten un nivell d'apoptosi equivalent al que mostra el grup de pacients VIH positius sense tractament, la qual cosa indica que l'administració continuada del TARGA no té efectes proapoptòtics, al menys en múscul esquelètic. Cal tenir en compte, que els miòcits són cèl·lules multinucleades i, per tant, el significat de l'apoptosi en aquests tipus cel·lulars difereix del que pot significar aquest procés de mort cel·lular programada en la resta de cèl·lules amb un sol nucli. En el cas dels miòcits, la degradació d'un o més nuclis no desencadenaria necessàriament la mort de la cèl·lula, sinó que en tot cas pot provocar atròfia de les fibres musculars. Això contrastaria amb el que es pot observar en els adipòcits dels pacients amb LD, on el Dr. P. Domingo i col·laboradors han observat que existeix un increment clar dels fenòmens apoptòtics (Domingo P, AIDS 1999).

En definitiva, creiem que els dos treballs presentats en aquesta última secció de la Tesi permeten concloure que la infecció pel VIH exerceix efectes nocius en els mitocondris, els quals podrien estar mediat per un efecte proapoptòtic del VIH. En aquest context, els efectes tòxics mitocondrials que en la pràctica clínica s'observen en els pacients infectats pel VIH que reben TARGA, serien el reflexe de la diferència entre l'efecte negatiu directe dels ARVs sobre els mitocondris i l'efecte beneficiós indirecte que aquests causen pel fet de reduir la càrrega viral (disminuint l'efecte negatiu del propi virus sobre els mitocondris).

