

**VALOR DE LA DETERMINACIÓN DE LA RATIO  
ADNmt/ADNn EN LA EVALUACIÓN DE TOXICIDAD  
MITOCONDRIAL EN UNA COHORTE DE PACIENTES  
INFECTADOS POR EL VIH EN TRATAMIENTO  
ANTIRRETROVIRAL ESTABLE**

Trabajo presentado por Marina Gallo Marín, licenciada en  
Medicina, para optar al grado de Doctor

*Fdo: Marina Gallo Marín.*

Córdoba, 1 de Diciembre de 2008

TITULO: VALOR DE LA DETERMINACIÓN DE LA RATIO ADN<sub>mt</sub>/ADN<sub>n</sub> EN LA  
EVALUACION DE TOXICIDAD MITOCONDRIAL EN UNA COHORTE  
DE PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH EN TRATAMIENTO  
ANTIRRETROVIRAL ESTABLE  
AUTOR: MARINA GALLO MARIN

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2009  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---

ISBN-13: 978-84-7801-930-4  
D.L.: CO-507-2009

**D. ANTONIO RIVERO ROMÁN, PROFESOR ASOCIADO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE CÓRDOBA Y JEFE DE SECCIÓN DE LA UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE REINA SOFÍA.**

**HAGO CONSTAR:**

Que el trabajo titulado "VALOR DE LA DETERMINACIÓN DE LA RATIO ADNmt/ADNn EN LA EVALUACIÓN DE TOXICIDAD MITOCONDRIAL EN UNA COHORTE DE PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH EN TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL ESTABLE" ha sido realizado por Dña. Marina Gallo Marín bajo mi dirección y que reúne los méritos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente y poder optar al grado de Doctor en Medicina.

Lo que firmo en Córdoba, a 1 de Diciembre de 2008

Fdo: Dr. Rivero Román

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

**D. ANTONIO MARTÍNEZ PEINADO, MEDICO ESPECIALISTA EN BIOQUIMICA CLINICA Y EN MEDICINA FAMILIAR Y COMUNITARIA, DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, F.E.A DE LA UNIDAD DE GENETICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y FERTILIDAD DEL SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS Y TUTOR DE RESIDENTES DE BIOQUIMICA CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE REINA SOFÍA.**

**HAGO CONSTAR:**

Que el trabajo titulado "VALOR DE LA DETERMINACIÓN DE LA RATIO ADNmt/ADNn EN LA EVALUACIÓN DE TOXICIDAD MITOCONDRIAL EN UNA COHORTE DE PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH EN TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL ESTABLE" ha sido realizado por Dña. Marina Gallo Marín bajo mi dirección y que reúne los méritos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente y poder optar al grado de Doctor en Medicina.

Lo que firmo en Córdoba, a 1 de Diciembre de 2008

Fdo: Dr. Martínez Peinado

**ÍNDICE ANALÍTICO**

ÍNDICE ANALÍTICO.....	4
ÍNDICE DE TABLAS .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	9
1.- INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.....	9
1.1. Características virológicas.....	9
1.2. Patogenia y clínica.....	9
2.- TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL.....	11
2.1. Principios generales .....	11
2.2. Cuándo iniciar el TAR .....	11
2.3. Régimen terapéutico inicial .....	12
2.4. Toxicidad asociada al tratamiento antirretroviral .....	14
3.- ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA MITOCONDRIA. GENÉTICA MITOCONDRIAL .....	16
3.1. Introducción. Origen de las mitocondrias .....	16
3.2. Funciones de la mitocondria .....	17
3.3. Estructura de la mitocondria. Mecanismos de producción de energía celular.....	18
3.4. Genética mitocondrial .....	19
4.- TOXICIDAD MITOCONDRIAL. PRINCIPIOS GENERALES. ....	22
4.1. Mecanismos generales de toxicidad mitocondrial .....	22
4.2. Toxicidad mitocondrial: Limitaciones y consideraciones previas .....	22
4.3. Manifestaciones clínicas de toxicidad mitocondrial .....	23
4.3.1. <i>Hiperlactacidemia y acidosis láctica:</i> .....	23
4.3.2. <i>Miopatía</i> .....	24
4.3.3. <i>Miocardopatía</i> .....	25
4.3.4. <i>Toxicidad hematológica</i> .....	25
4.3.5. <i>Neuropatía periférica</i> .....	25
4.3.6. <i>Pancreatitis</i> .....	26
4.3.7. <i>Lipodistrofia</i> .....	26
4.4. Manejo de la toxicidad mitocondrial.....	27
5.- MECANISMOS DE TOXICIDAD MITOCONDRIAL .....	28
5.1. Tratamiento antirretroviral con ITIAN y toxicidad mitocondrial .....	28

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

5.1.1. Depleción de ADNmt. Evidencias clínicas .....	29
5.1.2. Depleción de ARNmt. Evidencias clínicas .....	30
5.1.3. Daño directo al ADNmt. Evidencias clínicas.....	31
5.1.4. Otros mecanismos de toxicidad mitocondrial mediados por los ITIAN.....	31
5.1.5. El círculo vicioso del daño mitocondrial .....	32
5.2. Infección por el VIH y toxicidad mitocondrial .....	33
5.2.1 Evidencias clínicas .....	33
5.2.2 Mecanismos de daño mitocondrial mediados por el VIH.....	34
5.3. Coinfección por el VHC y toxicidad mitocondrial .....	35
5.3.1. Infección por el VHC y disfunción mitocondrial: aspectos fisiopatológicos.....	36
5.3.2. Coinfección VIH/VHC: manifestaciones clínicas de toxicidad mitocondrial.....	36
5.3.3. Coinfección VIH/VHC: interacciones farmacológicas. ....	37
6.- INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	39
6.1. Métodos bioquímicos: función enzimática y consumo de oxígeno ...	39
6.2. Métodos genéticos.....	39
6.2.1. Métodos cualitativos .....	39
6.2.2. Métodos cuantitativos .....	40
6.3. Limitaciones actuales y posibilidades futuras .....	40
II. HIPÓTESIS.....	42
III. OBJETIVOS .....	43
IV. MATERIAL Y MÉTODO .....	44
1. Diseño y población: .....	44
1.1. Diseño del estudio .....	44
1.2. Población .....	44
2. Protocolo del estudio: .....	45
3. Técnicas de laboratorio utilizadas.....	46
3.1 Determinación de la ratio ADNmt/ADNn: .....	46
3.2 Determinación de los niveles de linfocitos CD4.....	49
3.3 Determinación de la carga viral del VIH .....	50
4. Estudio estadístico.....	50

V. RESULTADOS .....	52
1. Análisis descriptivo .....	52
1.1. Grupo A: Pacientes infectados por el VIH y con TAR .....	52
1.2. Grupo B: Pacientes infectados por el VIH y sin TAR (naives) .....	53
1.3. Grupo C: Pacientes sin infección por el VIH .....	54
2. Análisis univariante .....	56
2.1. Influencia del sexo .....	56
2.2. Influencia del VIH .....	57
2.3. Influencia del TAR .....	59
2.4. Influencia del VHC .....	61
2.5. Influencia de la coinfección VIH/VHC .....	63
2.6. Análisis univariante: tabla de resultados .....	65
3. Análisis multivariante .....	66
VI. DISCUSIÓN .....	68
VII. CONCLUSIONES .....	77
VIII. GLOSARIO .....	78
IX. ANEXO .....	79
X. BIBLIOGRAFÍA .....	81

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación de la infección por VIH y criterios de SIDA para adultos y adolescentes en Europa .....	10
Tabla 2.- Combinaciones de TAR de inicio en pacientes <i>naïves</i> .....	13
Tabla 3.- Toxicidad específica de clase de los antorretrovirales.....	15
Tabla 4.- Principales funciones de las mitocondria. ....	17
Tabla 5.- Características basales del grupo A.....	52
Tabla 6.- Historia de infección por el VIH del Grupo A .....	53
Tabla 7.- Características basales del Grupo B .....	53
Tabla 8.- Historia de infección por el VIH del Grupo B .....	54
Tabla 9.- Características basales del Grupo C .....	55
Tabla 10.- Análisis univariante: VIH <i>naïves</i> vs VIH con TAR (basado en IP ó ITINAN) .....	59
Tabla 11.- Análisis univariante. . ....	65
Tabla 12.- Análisis multivariante de regresión lineal múltiple .....	66



**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.- Ciclo biológico del VIH .....	9
Figura 2.- Estructura de la mitocondria. ....	16
Figura 3.- Representación esquemática de los procesos energéticos que tienen lugar en la mitocondria.....	19
Figura 4.- Genoma mitocondrial .....	20
Figura 5.- Esquema de los potenciales mecanismos de toxicidad mitocondrial de los ITIAN .....	32
Figura 6.- Toxicidad acumulada sobre el ADNmt .....	33
Figura 7.- MagNAPure.....	46
Figura 8.- LightCycler 1.5 .....	46
Figura 9.- Melting.....	48
Figura 10.- Curvas de amplificación .....	48
Figura 11.- Análisis univariante: Hombres vs mujeres .....	56
Figura 12.- Análisis univariante: VIH+ vs VIH- .....	57
Figura 13.- Análisis univariante: VIH+ vs VIH- (incluyendo coinfectados por el VHC).....	58
Figura 14.- Análisis univariante: VIH con TAR vs VIH <i>naïves</i> .....	59
Figura 15.- Análisis univariante: IP vs ITINAN .....	60
Figura 16.- Análisis univariante: TNF vs ddI .....	60
Figura 17.- Análisis univariante: VHC+ vs VHC- .....	61
Figura 18.- Análisis univariante: VIH+/VHC+ vs VIH+/ VHC- .....	62
Figura 19.- Análisis univariante: VIH en TAR/VHC+ vs VIH en TAR/VHC-..	62
Figura 20.- Análisis univariante: VIH+/VHC+ vs VIH-/VHC+ .....	63
Figura 21.- Esquema de ratio ADNmt/ADNn según combinaciones entre VIH y VHC.....	64

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.- INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA**

#### ***1.1. Características virológicas***

El virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un retrovirus. Fue aislado por primera vez en el Instituto Pasteur de París en 1983, y hasta el momento se han identificado dos tipos, el VIH-1 y el VIH-2. El primero es el causante de la mayoría de los casos de la actual pandemia de SIDA, que en 2007 afectaba a unos 33 millones de personas a nivel mundial[1, 2].

#### ***1.2. Patogenia y clínica***

En su ciclo biológico el VIH atraviesa diversas etapas, como queda reflejado en la figura 1:

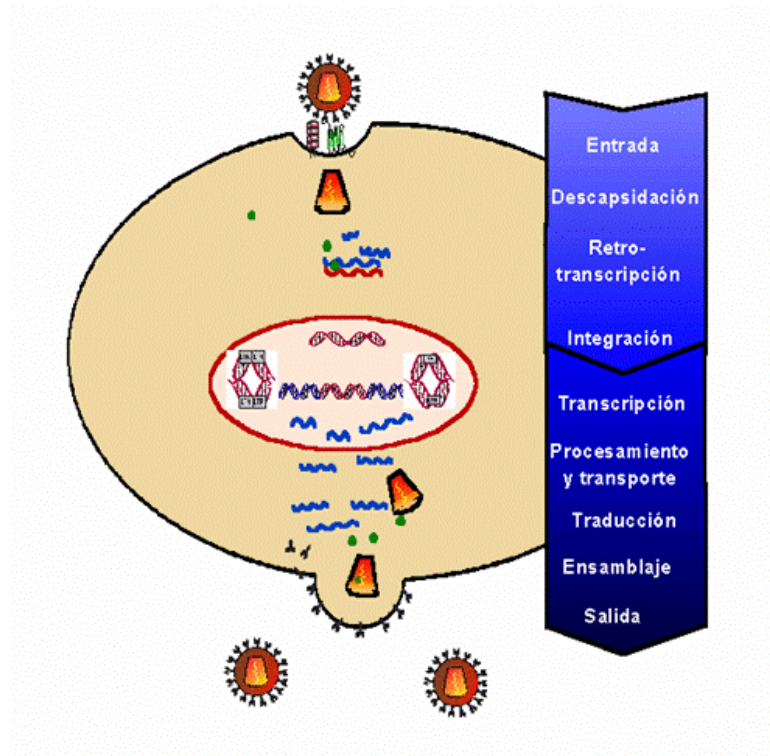


Figura 1.- Ciclo biológico del VIH

En ausencia de tratamiento antirretroviral (TAR) el VIH se replica de forma continua y muy intensa desde el momento de la inoculación hasta la muerte del paciente. La introducción del TAR, que consigue una inhibición sostenida de la replicación viral, hace posible la reconstitución del sistema inmune incluso en fases avanzadas de la enfermedad. [3, 4].

Los estadios clínicos están basados en criterios clínico-inmunológicos, en función de la sintomatología y del recuento de linfocitos CD4 (Tabla 1). Esta clasificación fue formulada por los *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* en 1993.

La categoría clínica A incluye a sujetos con primoinfección y asintomáticos, con o sin linfadenopatía generalizada persistente. La categoría B engloba a pacientes con síntomas actuales o pasados de enfermedades que, aunque están relacionadas con el VIH, no pertenecen a la categoría C. La categoría C incluye pacientes con síntomas actuales o pasados de enfermedades incluidas en la definición de SIDA. En Europa se considera SIDA a las categorías C1, C2, C3[5-7] mientras que en EEUU se considera SIDA a cualquier paciente con criterios de pertenecer a la categoría C o recuento de linfocitos CD4 < 200 céls/ $\mu$ l.

Categorías inmunológicas	Categorías clínicas		
	A1	B1	C1
$\geq 500/\mu\text{l}$ ( $\geq 29\%$ )	A1	B1	C1
200-499/ $\mu\text{l}$ (14-28%)	A2	B2	C2
<200/ $\mu\text{l}$ (<14%)	A3	B3	C3

Tabla 1.- Clasificación de la infección por VIH y criterios de SIDA para adultos y adolescentes en Europa

## **2.- TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL**

### ***2.1. Principios generales***

Aunque en la mayoría de las enfermedades infecciosas el objetivo ideal del tratamiento es la completa erradicación del patógeno responsable, esto resulta inalcanzable en el caso de la infección por el VIH, debido a la persistencia de reservorios de virus latentes. Por ello el objetivo principal del TAR es conseguir una respuesta viral sostenida que impida o revierta el deterioro inmunitario de los pacientes y, con ello, el desarrollo de infecciones o tumores oportunistas, la progresión a SIDA y la muerte[8, 9]. La elección adecuada de los fármacos permite obtener un efecto sinérgico, disminuye la aparición de resistencias y permite la acción simultánea sobre diferentes sistemas celulares así como la actuación sobre distintas fases del ciclo replicativo del virus[10]. Las limitaciones de los tratamientos actuales son la necesidad de un cumplimiento muy estricto y la toxicidad dependiente de la duración del tratamiento[11].

### ***2.2. Cuándo iniciar el TAR***

La decisión de iniciar el TAR depende de tres factores: la presencia o no de síntomas, la carga viral (CV) y el recuento de CD4.

Las guías de práctica clínica más recientes[12, 13] recomiendan iniciar el TAR en todo paciente sintomático con independencia de sus cifras de linfocitos CD4+. Si la infección es asintomática el inicio se basa en el número de CD4, la CV o en determinadas comorbilidades o características del paciente:

- Si CD4 <350 células/ $\mu$ L se recomienda iniciar TAR (nivel A).
- Si el número de CD4 está entre 350 y 500 células/ $\mu$ L, se recomienda el TAR en los pacientes con ciertas comorbilidades (cirrosis hepática, hepatitis crónica por virus C, hepatitis B con indicación de tratamiento, CV >10<sup>5</sup> copias/mL, proporción de CD4 <14%, edad >55 años, riesgo cardiovascular elevado y nefropatía VIH) (nivel B).

- Si CD4 >500 células/ $\mu$ L se recomienda diferir el TAR en general. Sin embargo debe ser considerado en los pacientes con las comorbilidades mencionadas previamente.

En mujeres embarazadas se debe iniciar TAR con independencia de las cifras de CD4[13].

A pesar de las consideraciones previas, el inicio del TAR debe valorarse siempre individualmente. Debe prepararse al paciente, ofertando las distintas opciones, adaptando el esquema terapéutico al estilo de vida, comorbilidades, posibles interacciones y valorando el riesgo de mala adherencia.

### **2.3. Régimen terapéutico inicial**

La primera condición a exigir a un régimen de tratamiento es que sea lo suficientemente potente para conseguir una supresión máxima y duradera de la replicación viral. Un régimen de TAR que no logre la supresión de la replicación viral en un periodo de tiempo de seis meses puede comprometer su propia eficacia a largo plazo y la eficacia de regímenes posteriores. Además hay que individualizar el régimen en función de la tolerabilidad, los efectos adversos, las interacciones farmacológicas, la preservación de opciones terapéuticas futuras y los resultados de los estudios de resistencia [8].

En general se recomienda iniciar el TAR con una combinación de dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótidos/nucleósidos (ITIAN) acompañados de un inhibidor de la transcriptasa inversa no-análogo de nucleósido (ITINAN), o bien de un inhibidor de la proteasa (IP) potenciado ó no con ritonavir.

En la siguiente tabla se expresan las últimas recomendaciones sobre TAR de inicio en adultos y adolescentes *naïves* (que nunca han recibido TAR) del Grupo Español de Estudio sobre el SIDA (GESIDA) y del *Department of Health and Human Services* (DHHS) [12, 13]:

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

<b>GESIDA<sup>1</sup></b>	
<b>Regímenes preferentes</b>	2 ITIAN <sup>a</sup> + 1 ITINAN ó IP <sup>b</sup>
<b>Regímenes alternativos</b>	2 ITIAN <sup>c</sup> + 1 ITINAN ó IP <sup>d</sup>
<b>DHHS<sup>2</sup></b>	
<b>Regímenes preferentes</b>	
- Basados en ITINAN	<i>Efavirenz + Tenofovir/Emtricitabina (coformulado)</i> [Nota: No se recomienda efavirenz en el primer trimestre del embarazo ni en mujeres con alta probabilidad de embarazo]
- Basados en IP	<i>Atazanavir/r QD ó Darunavir/r QD ó Fosamprenavir/r BID ó Lopinavir/r QD ó BID + Tenofovir/Emtricitabina (coformulado)</i>
<b>Regímenes alternativos</b>	
- Basados en ITINAN	<i>Nevirapina + (lamivudina o emtricitabina) + (zidovudina o estavudina o didanosina o abacavir o tenofovir)</i>
- Basados en IP	<i>Atazanavir QD ó Fosamprenavir BID ó Fosamprenavir/r QD ó Saquinavir/r BID + Abacavir/Lamivudina* (coformulado) ó Didanosina con Lamivudina ó Emtricitabina ó Zidovudina/Lamivudina<sup>§</sup> (coformulado)</i>

Tabla 2.- Combinaciones de TAR de inicio en pacientes *naïves*

<sup>1</sup>GESIDA. Recomendaciones de Gesida y PNS sobre el tratamiento antirretroviral del adulto (2009; Borrador para discusión pública). Disponible en:

[http://www.gesida.seimc.org/pcientifica/fuentes/DcyRc/Gesida\\_dcyrcBR2008RecomendacionesTARGESIDA-PNS\\_ver2009-para%20discusion%20publica.pdf](http://www.gesida.seimc.org/pcientifica/fuentes/DcyRc/Gesida_dcyrcBR2008RecomendacionesTARGESIDA-PNS_ver2009-para%20discusion%20publica.pdf).

<sup>2</sup>DHHS. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. November 3, 2008; 1-138. Disponible:

<http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>

<sup>a</sup>: Tenofovir ó Abacavir más Lamivudina ó Emtricitabina.

<sup>b</sup>: Efavirenz (EFV), Lopinavir/r BID o QD, Fosamprenavir/r BID, Atazanavir/r QD ó Saquinavir/r BID.

<sup>c</sup>: Zidovudina, Didanosina ó Estavudina más Lamivudina ó Emtricitabina.

<sup>d</sup>: Nevirapina, Atazanavir, Fosamprenavir/r QD ó BID.

\*: Pacientes negativos para el HLA-B\*5701.

§: Emtricitabina y Lamivudina pueden ser utilizados uno en lugar del otro.

La mayor parte de las guías consideran la combinación de tres ITIAN como un régimen alternativo a los dos regímenes anteriores y recomienda no usar regímenes formados con combinaciones de las tres familias de fármacos.

#### **2.4. Toxicidad asociada al tratamiento antirretroviral**

La toxicidad farmacológica constituye el principal motivo de interrupción y modificación de TAR, por delante del fracaso virológico y de la falta de adherencia debida a otras causas.

En cuanto a los factores que predisponen al desarrollo de toxicidad, varios estudios comparativos han puesto de manifiesto una mayor incidencia en las mujeres de determinados efectos adversos del TAR, tales como reacciones de hipersensibilidad, toxicidad hepática, acidosis láctica, dislipemia, resistencia a la insulina, lipodistrofia, etc.[14-17]. Se piensa que en este hecho pueden influir diferencias genéticas, hormonales y estructurales (masa corporal y composición grasa del organismo), las cuales influirían sobre el metabolismo enzimático y la farmacocinética de los antirretrovirales (ARV)[17, 18].

Es posible que la edad avanzada favorezca también la toxicidad del TAR, ya que a partir de los 60 años se produce un deterioro de las funciones hepática y renal, existen cambios farmacocinéticos que aumentan las concentraciones plasmáticas de los fármacos y aparecen enfermedades que requieren de la realización de tratamientos concomitantes. Dado que la edad media de los pacientes con infección por el VIH que realizan TAR es cada vez más elevada, la relación edad-toxicidad es un tema que demanda la realización de estudios que mejoren su conocimiento[19].

Mucha menor trascendencia parecen tener la carga viral[20, 21], el número de linfocitos CD4[22], el haber realizado previamente otros tratamientos antirretrovirales[22, 23], etc.

El espectro de efectos adversos ocasionados por los fármacos antirretrovirales es muy amplio[24-27].

Existe una toxicidad inespecífica provocada por numerosos ARV de distintas familias, como la hepatitis o los trastornos gastrointestinales, y una toxicidad específica para cada grupo. En la siguiente tabla se muestra un resumen de la toxicidad específica de clase de los antirretrovirales:

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

Clase de antirretrovirales	Efectos adversos
I.T.I. Análogos de los nucleósidos	<i>Daño mitocondrial</i>
I.T.I. Análogos de los nucleótidos	<i>Disfunción del túbulo renal proximal</i>
I.T.I. No análogos de los nucleósidos	<i>Reacciones de hipersensibilidad</i>
Inhibidores de la proteasa	<i>Trastornos metabólicos y lipodistrofia</i> <i>Efecto retinoide</i>
Inhibidores de la fusión	<i>Reacciones locales en el sitio de inyección</i>

Tabla 3.- Toxicidad específica de clase de los antorretrovirales

La extraordinaria frecuencia, diversidad y morbilidad de los efectos adversos de los ARV ha tenido un gran impacto sobre la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos, a los que cada vez se les exige un perfil de seguridad más favorable.



### 3.- ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA MITOCONDRIA. GENÉTICA MITOCONDRIAL

#### 3.1. Introducción. Origen de las mitocondrias

Las mitocondrias (del griego *mitos* = hilo, hebra; *chondros* = grano, terrón, cartílago), fueron identificadas a finales del siglo XIX. Son orgánulos presentes en todas las células excepto en los hematíes. Su función principal es la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) a través del proceso de fosforilación oxidativa. Estructuralmente, poseen una doble membrana, moléculas de ADN circulares y sistemas específicos de transcripción, traslación y ensamblaje de proteínas. Todas estas características sugieren que las mitocondrias debieron ser organismos independientes hace mucho tiempo.

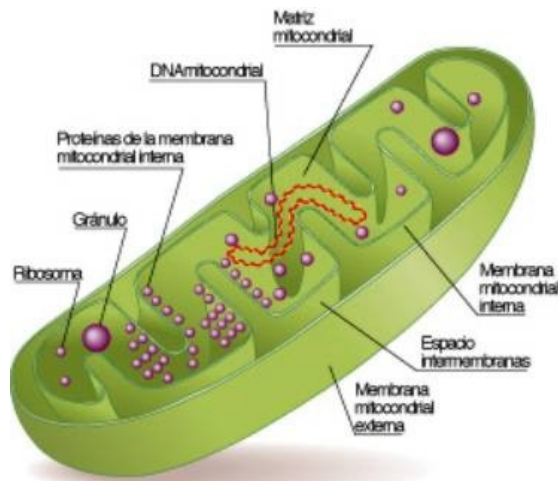


Figura 2.- Estructura de la mitocondria. Tomada de [www.profesoresenlinea.cl](http://www.profesoresenlinea.cl)

Se piensa que las mitocondrias han evolucionado a partir de bacterias simbióticas en una fase muy inicial de las formas vivientes, cuando hace más de un billón de años la atmósfera de la tierra era todavía pobre en oxígeno y la mayor parte de los organismos unicelulares primitivos dependían de la fermentación anaeróbica de las moléculas orgánicas. Se ha sugerido que una pequeña bacteria que había desarrollado la capacidad de utilizar el oxígeno invadió un tipo celular anaeróbico más grande, estableciéndose así una relación simbiótica en la que el endosimbionte aeróbico producía energía a cambio de la protección y de las

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

sustancias nutritivas proporcionadas por la gran célula huésped. Con el tiempo, la interdependencia de los dos elementos aumentó y el parásito se convirtió en un orgánulo celular indispensable que era transmitido por la célula a su descendencia.

### 3.2. Funciones de la mitocondria

La función principal de la mitocondria es proporcionar energía a la célula en forma de ATP. El número de mitocondrias presentes en una célula va a depender de los requerimientos energéticos de la misma; por ejemplo, un hepatocito, un miocito o un adipocito contienen cientos de miles de mitocondrias, mientras que una plaqueta puede contener sólo unas pocas. Además las mitocondrias desarrollan otras muchas funciones (Tabla 4).

Producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa
Síntesis de la mayoría de los componentes de la cadena respiratoria (Subunidades 1, 2 y 3 de la citocromo oxidasa, Subunidades 6, 8 y 9 de la Fo ATPasa, Subunidad Apocitocromo b de la CoQH2-citocromo c reductasa, y 7 subunidades de la NADH-CoQ reductasa), y de los lugares de actividad de los ribosomas y RNAt: 22 tRNAs <sub>16S</sub> , 12S, 5S).
Participación en la homeostasis intracelular del calcio
Defensa frente a especies reactivas de oxígeno
Conexiones con el retículo endoplásmico y la membrana celular para el mantenimiento de gradientes electroquímicos
Regulación de la apoptosis mediante el almacenamiento y liberación de moléculas inductoras de la apoptosis (Citocromo C y Factor inductor de la apoptosis), o mediante la inhibición de moléculas con propiedades antioxidantes como la bcl-2).
Introducción a través de los canales dependientes de voltaje de al menos 1500 proteínas codificadas por el ADN nuclear
Síntesis del grupo <i>hem</i> en hepatocitos y precursores hematopoyéticos
Localización de los receptores periféricos para benzodiazepinas en la membrana externa mitocondrial
Participación en el primer paso de la esteroidogénesis (transformación del colesterol en pregnenolona) y en la homeostasis intracelular de las hormonas sexuales esteroideas
Producción de calor en la grasa parda a través de la acción de la proteína <i>termogenina</i> (UCP-1), con acción desacopladora de la fosforilación oxidativa
Papel en el envejecimiento celular con la depleción y los daños en el ADNmt
Desarrollo de patologías genéticas secundarias a mutaciones en el DNAm

Tabla 4.- Principales funciones de las mitocondria. Tomado de[28]

La participación de la mitocondria en la muerte celular programa o apoptosis apoya la hipótesis de una simbiosis primitiva entre una bacteria oxidativa y una célula eucariota [28]. Estos orgánulos pueden representar un papel dual, al ser no sólo capaces de producir la mayor parte de la energía de la célula, sino también de generar o amplificar señales que conducen a la muerte celular.

Las mitocondrias poseen un sistema autonómico que les permite degradarse ante la presencia de un daño irreversible, ejecutando un proceso denominado "mitoptosis". Una mitoptosis masiva debida a un estímulo intenso, como, por ejemplo, el proporcionado por la existencia de grandes cantidades de especies de oxígeno reactivas, puede dar lugar a apoptosis a través de la liberación de proteínas apoptógenas como el citocromo C y el factor inductor de la apoptosis, presentes en el interior de la mitocondria en condiciones normales. Se ha sugerido que las mitocondrias desempeñan un papel ejecutor central en la apoptosis celular[29] y que la caída de su potencial de membrana puede ser un elemento común del programa apoptótico.

### ***3.3. Estructura de la mitocondria. Mecanismos de producción de energía celular***

El ATP puede producirse a partir de ácidos grasos de cadena corta, media o larga o a partir del piruvato (derivado a su vez de la glucosa). En el interior de la mitocondria los ácidos grasos sufren un proceso de  $\beta$ -oxidación que los acorta progresivamente en dos átomos de carbono por ciclo y genera acetil-coenzima A (acetil-CoA), nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y flavin adenín dinucleótido. El ácido pirúvico es también convertido en acetil-CoA por la piruvato deshidrogenada en la matriz mitocondrial, y ello forma parte del metabolismo aeróbico de la glucosa (figura 2).

En ausencia de un adecuado metabolismo mitocondrial, los ácidos grasos se acumulan en la mitocondria y en el citoplasma en forma de gotitas lipídicas y el piruvato es metabolizado a lactato en el citoplasma, configurando todo ello el metabolismo anaeróbico de la glucosa.

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

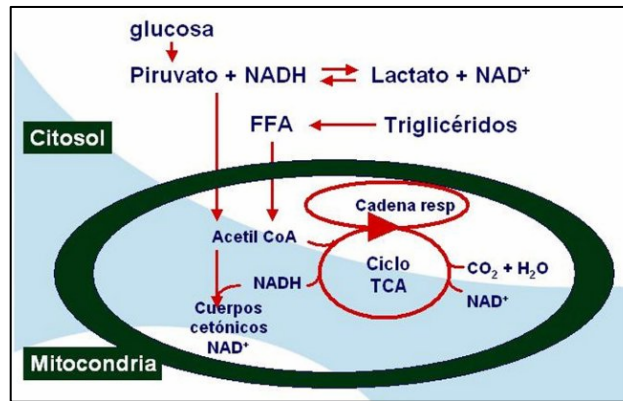


Figura 3.- Representación esquemática de los procesos energéticos que tienen lugar en la mitocondria. Tomado de [30].

El acetil-CoA alimenta el Ciclo de Krebs para generar NADH adicional, que a su vez es el sustrato de la fosforilación oxidativa, la vía de producción de energía de máxima eficiencia de la mitocondria. La fosforilación oxidativa es realizada por cinco complejos enzimáticos localizados en la membrana mitocondrial interna. Los complejos I y II, que incluyen la ubiquinona (coenzima Q-10) y los complejos III y IV, que contienen citocromos, transportan electrones derivados del NADH para formar un gradiente de protones que se halla acoplado al complejo V, la ATP sintetasa, permitiendo la formación de ATP a partir de ADP citosólico y de fosfato inorgánico.

### 3.4. Genética mitocondrial

Las mitocondrias poseen su propio ADN (ADNmt), así como su ARN ribosómico, de transferencia y mensajero. El genoma mitocondrial es una molécula circular, de doble hebra, que contiene 37 genes codificados por 16.569 pares de bases (según la secuencia Cambridge revisada). De estos genes, 24 (2 para dos ARN ribosómicos y 22 para ARN de transferencia) se necesitan para la transcripción del ADNmt, y 13 codifican subunidades de la cadena respiratoria (siete subunidades del complejo I, una subunidad del complejo III, tres subunidades del complejo IV y dos subunidades del complejo V)[31]. Por tanto todos los complejos de la cadena de transporte de electrones, salvo el complejo II, codificado en su totalidad por el ADNn,

contienen en su estructura hasta un 20% de elementos codificados por el ADNmt (figura 3). El resto de las proteínas mitocondriales son sintetizadas en el citoplasma e importadas al interior de la mitocondria. Así mismo, todas las enzimas necesarias para la replicación y transcripción del ADNmt dependen también de los genes nucleares. Por tanto, aunque las mitocondrias tienen su propio genoma, no son genéticamente autosuficientes.

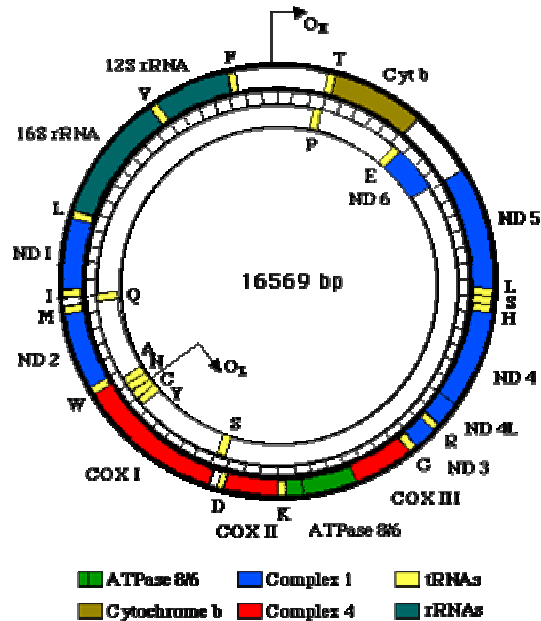


Figura 4.- Genoma mitocondrial

La replicación del ADNmt es llevada a cabo por la *polimerasa- $\gamma$* , una enzima codificada por el ADN nuclear (ADNn).

La genética mitocondrial difiere de la mendeliana en tres aspectos básicos:

- *Herencia materna*: tras la fertilización, el ADNmt espermático es degradado activamente, por lo que todo el ADNmt procede del óvulo materno.
- *Heteroplasmia*: en cada célula existen cientos de copias de ADNmt, por lo que las mutaciones deletéreas afectan a algunos pero no a todos los genomas. Por ello las células y los tejidos tienen dos poblaciones de ADNmt, el normal y el mutante, situación a la que se conoce como heteroplasmia. La poliplasmia es la circunstancia que se da cuando

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

conviven más de dos poblaciones debido a la existencia de más de un tipo de mutación.

- *Segregación mitótica*: consiste en la distribución no equitativa de las moléculas de ADNmt durante la división celular.

Es razonable asumir que debe existir un número mínimo de ADNmt mutante en un tejido antes de que aparezca disfunción tisular y las manifestaciones clínicas de la misma. Ese dintel o umbral patogénico debe ser menor en tejidos altamente dependientes del metabolismo oxidativo y mayor en aquellos tejidos que pueden adaptarse a la glicólisis anaerobia.

Las divisiones celulares repetidas con el consecuente reparto no equitativo de las moléculas de ADNmt contribuye a la variabilidad tiempo-dependiente de las manifestaciones clínicas frecuentemente observadas en los trastornos relacionados con el ADNmt. Esta teoría no explicaría los cambios en la proporción de ADNmt mutante en células que no experimentan división celular, como las células musculares esqueléticas y las neuronas. En estos casos se ha propuesto la replicación relajada del ADNmt como una explicación para estos cambios[32].

#### **4.- TOXICIDAD MITOCONDRIAL. PRINCIPIOS GENERALES.**

##### ***4.1. Mecanismos generales de toxicidad mitocondrial***

Las mitocondrias pueden desarrollar una disfunción a través de múltiples mecanismos. Por ejemplo, los inhibidores de la proteasa (IP), pueden afectar a enzimas cruciales para el metabolismo lipídico, produciendo alteraciones en forma de hiperlipemia, resistencia a la insulina y apoptosis adipocitaria. Estas alteraciones tienen un profundo efecto sobre la funcionalidad mitocondrial. Pueden dar lugar a esteatosis hepática, disminuyendo la capacidad funcional del hígado y la eliminación de lactato, ocasionando por tanto hiperlactacidemia y, en raras ocasiones, acidosis láctica[33].

Por otro lado, el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) puede dañar a la mitocondria a través de sus efectos oxidativos y metabólicos[34]. Finalmente, los ITIAN inciden en la cantidad de ADNmt y en la función mitocondrial a través de un variado abanico de mecanismos, y han demostrado ser causa de aparición de gran número de eventos clínicos de toxicidad mitocondrial[35]. Su papel será desarrollado con profundidad más adelante.

##### ***4.2. Toxicidad mitocondrial: Limitaciones y consideraciones previas***

El estudio molecular y clínico de la toxicidad mitocondrial tiene muchas limitaciones[36]. En primer lugar, la baja incidencia de efectos adversos graves asociados a toxicidad mitocondrial ha supuesto un reto para los estudios con población infectada por el VIH. En segundo lugar, muchas de las manifestaciones clínicas de toxicidad mitocondrial (neuropatía, miopatía, lipoatrofia...) son difíciles de cuantificar de manera estandarizada en la práctica clínica. Además, la mayoría de los estudios publicados han contado con una población de estudio pequeña, y muchas veces con un diseño transversal. En los estudios longitudinales, la falta de asociación estadísticamente significativa entre los niveles de ADNmt y una determinada clínica eran reseñables pero imputables a la falta de potencia del estudio, limitando las conclusiones[36]. Otro aspecto limitante ha sido el desconocimiento del tiempo existente entre la inducción del daño mitocondrial y la aparición de los síntomas, lo que en muchos casos ha

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

impedido establecer relaciones de causalidad. Finalmente, las diferencias en los tejidos estudiados y en las técnicas y metodologías empleadas contribuyen a explicar las discrepancias existentes en la literatura científica[37, 38].

#### ***4.3. Manifestaciones clínicas de toxicidad mitocondrial***

La toxicidad mitocondrial puede adoptar múltiples formas de presentación, y aunque suele predominar la afectación de órganos y tejidos altamente dependientes de energía como el músculo esquelético y cardíaco, también se pueden observar alteraciones mucho más específicas y sorprendentes, como la pancreática y la del tejido adiposo[39].

##### ***4.3.1. Hiperlactacidemia y acidosis láctica:***

La acidosis láctica es la manifestación más temida de disfunción mitocondrial. En condiciones normales existen niveles de lactato en sangre, pero el pH se mantiene compensado. Se puede producir hiperlactacidemia al aumentar los requerimientos energéticos del organismo, por hipoxia ó hipoperfusión, al aumentar la liberación de lactato celular (hiperinsulinemia) o por alteración de los mecanismos de aclaramiento. En general la elevación de las cifras de lactato en sangre es un marcador del fracaso energético de la célula.

Los estados de hiperlactacidemia constituyen una gradación de situaciones clínicas que van desde la hiperlactacidemia asintomática o compensada hasta la acidosis láctica grave y frecuentemente mortal. En pacientes tratados con ITIAN se ha descrito hiperlactacidemia leve asintomática (lactato venoso=2-5 mmol/l) en 10-20% de individuos por año[40, 41], siendo la hiperlactacidemia sintomática más rara. La acidosis láctica es muy infrecuente, con una incidencia de 4-5 casos por 1000 pacientes/año de tratamiento[40, 42, 43]. Se ha descrito en personas que recibían combinaciones que incluían uno o dos ITIAN, entre ellos zidovudina (AZT) ó estavudina (d4T) con didanosina (ddI), zalcitabina (ddC) ó lamivudina (3TC). La combinación terapéutica de mayor riesgo según varios estudios de cohortes es la que contiene estavudina más didanosina[40, 41]. El riesgo de acidosis láctica parece ser mayor en mujeres, en personas obesas



y en aquellas con coinfección por algún virus hepatotropo[44]. Las manifestaciones clínicas más frecuentes de la acidosis láctica son náuseas, vómitos, dolor abdominal, disnea, pérdida de peso y parestesias. La mortalidad del cuadro varía entre el 30 y el 50%. Debido a la potencial gravedad de la acidosis láctica se ha tratado de encontrar marcadores para predecir su desarrollo. Un estudio realizado en pacientes en tratamiento con ITIAN mostró una depleción de la ratio ADNmt/ADNn en monocitos de sangre periférica meses antes de que se desarrollara una hiperlactacidemia sintomática. La correlación entre niveles de lactato y ratio ADNmt/ADNn fue muy débil. La suspensión del tratamiento llevó a un incremento de los niveles de ADNmt y a un descenso de los de lactato[45]. La monitorización del lactato venoso en pacientes asintomáticos no ha demostrado ser útil para predecir el desarrollo de acidosis láctica. En primer lugar, los niveles de lactato varían en función de la técnica preanalítica (debe hacerse con el paciente en reposo y sin usar compresor), y en segundo lugar, parece que la hiperlactacidemia asintomática es frecuente en la población infectada por el VIH. El significado de esta elevación es desconocido, y los eventos que conducen a la progresión hacia hiperlactacidemia sintomática ó acidosis láctica no han sido definidos, aunque su valor predictivo respecto a la acidosis es pobre, por lo que no se recomienda su determinación rutinaria como predictor de acidosis láctica.

#### 4.3.2. Miopatía

La miopatía suele asociarse al tratamiento con zidovudina, cada vez más infrecuente. Clínicamente puede ser difícil de distinguir de la miopatía propia del VIH. Suele presentarse con mialgias, debilidad muscular, caquexia y elevación de las cifras de creatín-fosfoquinasa sérica (CK). Histológicamente la miopatía mitocondrial se caracteriza por la aparición en el músculo esquelético de las llamadas *ragged red fibers* como resultado de la acumulación subsarcolémica de mitocondrias[46]. Asimismo, se ha demostrado un descenso en el contenido de ADNmt en pacientes con miopatía por AZT[47].

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

#### 4.3.3. Miocardiopatía

Es un fenómeno muy infrecuente que se ha descrito tras tratamientos prolongados con ITIAN, especialmente con AZT. Se manifiesta clínicamente como una miocardiopatía dilatada, y en la biopsia endomiocárdica suelen aparecer vacuolas intramiocitarias, pérdida de miofibrillas, dilatación del retículo sarcoplásmico y perturbación de las crestas mitocondriales[48]. En general mejora tras la interrupción del tratamiento con ITIAN[49].

#### 4.3.4. Toxicidad hematológica

El tratamiento con AZT se ha asociado a toxicidad hematológica en forma de anemia, leucopenia y trombocitopenia que pueden en ocasiones simular las toxicidades secundarias a la infección por el VIH *per se*. La incidencia de anemia o neutropenia en adultos sintomáticos tratados con AZT se sitúa entre el 1,1% y el 9,7%[50]. Se sugiere que el AZT es capaz de inhibir la síntesis mitocondrial del grupo *hem* a través de la vía de polimerasa-y mitocondrial[51]. Los datos *in vitro* sugieren que ddC, ddI y d4T tienen una toxicidad similar[52, 53].

#### 4.3.5. Neuropatía periférica

En el curso de tratamientos con ddI, d4T y ddC se ha observado la aparición de una neuropatía axonal periférica indistinguible en muchas ocasiones de la causada por la propia infección por el VIH[54]. Clínicamente se caracteriza por la presencia de disestesias en los dedos de manos y pies, disminución de los reflejos osteotendinosos, pérdida sensitiva distal y debilidad muscular moderada. Los estudios electrofisiológicos confirman la afectación axonal y las histología suele mostrar una degeneración axonal y mitocondrias con crestas anómalas[46]. La duración del tratamiento con ITIAN neurotóxicos aumenta la probabilidad de desarrollo de neuropatía farmacológica y el efecto parece ser dosis-dependiente. Se consideran factores de riesgo para el desarrollo de neuropatía, un nadir de CD4 inferior a 100/mm<sup>3</sup>, la existencia de SIDA previo, la existencia de neuropatía previa, el uso de otros agentes neurotóxicos como el alcohol y la existencia de déficit vitamínico como los niveles bajos de hidroxicoalamina[55]. Se

ha sugerido que los niveles de lactato pueden ser útiles para diferenciar la neuropatía periférica por ITIAN de la asociada a la infección por el VIH.

#### *4.3.6. Pancreatitis*

El uso de ddI y 3TC se asocia a un riesgo dosis-dependiente de desarrollar pancreatitis. La incidencia oscila entre el 4% y el 7% a las dosis recomendadas actualmente[56]. Ocasionalmente la pancreatitis se asocia a casos de acidosis láctica grave.

#### *4.3.7. Lipodistrofia*

Se ha propuesto que la toxicidad mitocondrial inducida por los ITIAN puede también explicar los cambios asociados a los síndromes de redistribución de la grasa corporal. Esta hipótesis se apoya en estudios clínicos que han demostrado una estrecha asociación entre el uso de ITIAN, en particular d4T, y el desarrollo de lipoatrofia[57-60]. Diversos grupos han comunicado un descenso en el contenido de ADNmt en pacientes con lipoatrofia[61-64], así como anomalías estructurales mitocondriales sugestivas de disfunción[65]. Actualmente se sabe que el tejido adiposo juega un papel importante en la emisión de factores hormonales específicos (leptina, adiponectina, etc.) o citoquinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )[66], y que estos factores ejercen efectos a distancia influyendo en la eficiencia energética y la sensibilidad a la insulina. Un déficit en la función mitocondrial puede alterar la relación ATP/ADP celular y ello contribuir a la alteración en la liberación de todos estos factores que se observa en los pacientes lipodistróficos (aumento de ácidos grasos libres, disminución de adiponectina, etc.). Por tanto, la disfunción mitocondrial en el tejido adiposo puede explicar en parte problemas sistémicos asociados a la lipodistrofia, como el síndrome metabólico. Asimismo, la toxicidad mitocondrial genera un aumento en la producción de radicales libres de oxígeno (ROS), que puede favorecer la liberación de TNF- $\alpha$ , y contribuir a la muerte celular programada de los adipocitos y a la lipoatrofia presente en las zonas subcutáneas[66].

#### **4.4. Manejo de la toxicidad mitocondrial**

En la actualidad el manejo de la toxicidad mitocondrial secundaria a los ITIAN consiste básicamente en la retirada de los fármacos implicados, junto a un tratamiento de soporte dirigido a la corrección de las anomalías titulares. Es necesario tener un alto índice de sospecha dado lo inespecífico de la clínica en muchos casos. En general la retirada precoz de los fármacos implicados consigue revertir la toxicidad[67]. En la neuropatía periférica existen indicios prometedores sobre la eficacia de la lamotrigina, la gabapentina y el factor estimulador del crecimiento neuronal[55]. En pacientes con hiperlactacidemia o acidosis láctica se observa una lenta recuperación analítica tras la supresión del TAR[68]. Aunque se trata de un tema controvertido, se han comunicado mejorías en la lipoatrofia de algunos pacientes tras la retirada de la estavudina[69, 70].

La aparición de nuevos ITIAN con menor capacidad para inhibir la polimerasa- $\gamma$  mitocondrial, como el abacavir (ABC), tenofovir (TNF) ó emtricitabina (FTC)[71, 72], pueden permitir revertir parcialmente la toxicidad generada por los antiguos ITIAN. En caso de supervivencia se recomienda evitar los ITIAN, ó al menos los análogos de la timidina, en posteriores combinaciones terapéuticas.

Se han comunicado casos anecdóticos sobre la supuesta eficacia de suplementos dietéticos como el coenzima Q10, el dicloroacetato, la L-carnitina, la tiamina (vitamina B1), la riboflavina (vitamina B2) y las vitaminas C y E como quelantes de radicales libres[73-75]. Sin embargo, actualmente no existen estudios controlados que avalen su uso de forma preventiva ni terapéutica.

## **5.- MECANISMOS DE TOXICIDAD MITOCONDRIAL**

Aunque clásicamente se había relacionado la toxicidad mitocondrial con los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIAN), hoy en día se sabe que se trata de un fenómeno complejo, en que intervienen muchos factores. Algunas personas presentan factores genéticos predisponentes para daño mitocondrial, que pueden desenmascarse al adquirir la infección por el VIH o al recibir determinados fármacos. La infección por el virus de la hepatitis C (VHC), tan frecuente en los pacientes infectados por el VIH al compartir sus vías de transmisión, también ha demostrado reducir los niveles de ADNmt y producir una clínica derivada de ello.

### ***5.1. Tratamiento antirretroviral con ITIAN y toxicidad mitocondrial***

Desde que hace unos años se planteó que la vía principal de los efectos adversos causados por ITIAN era la toxicidad mitocondrial, múltiples estudios han tratado de explicar los mecanismos que llevaban a ella. La hipótesis inicial de la inhibición de la polimerasa- $\gamma$  mitocondrial por los distintos análogos de los nucleósidos dejaba múltiples preguntas sin respuesta.

Actualmente se sabe que la toxicidad mitocondrial mediada por los ITIAN es un fenómeno complejo y multifactorial. A las diferencias específicas entre cada fármaco y cada tejido en cuanto a actividad inhibitoria de la polimerasa- $\gamma$  hay que añadir las características del paciente, como su sexo, su peso, si está coinfectado o no por el VHC, la infección por el VIH *per se*, otras comorbilidades, factores genéticos, etc., que pueden influir en la incidencia y severidad de las manifestaciones clínicas de toxicidad mitocondrial.

A continuación se describen los posibles mecanismos por los cuales los análogos de los nucleósidos pueden producir daño mitocondrial, asumiendo la complejidad del proceso y la existencia de muchas cuestiones todavía sin aclarar.

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

#### 5.1.1. Depleción de ADNmt. Evidencias clínicas

Los ITIAN requieren de la fosforilación intracelular para ser activos. El mecanismo de inhibición de la transcriptasa inversa se produce tras la fosforilación y se basa en la competición con el nucleótido natural por un lugar en la cadena de ADN naciente. Los diferentes ITIAN inhiben *in vitro* a la polimerasa- $\gamma$  mitocondrial[35, 63, 72, 76], aunque existen variaciones en la afinidad por esta enzima. El fármaco con mayor afinidad es zalcitabina, seguido de didanosina, estavudina, lamivudina, zidovudina y abacavir. Tenofovir y emtricitabina parecen tener una baja afinidad *in vitro* por la polimerasa- $\gamma$ . La combinación de estavudina y didanosina parece ser, frente al resto de combinaciones de análogos, la que produce mayor depleción de ADNmt en sangre periférica[77].

Sin embargo no queda claro si existe correlación entre la depleción de ADNmt y la aparición de manifestaciones clínicas de toxicidad mitocondrial. Numerosos estudios han tratado de aclarar esta hipótesis, con resultados contradictorios.

Las primeras investigaciones demostraron niveles descendidos de ADNmt en músculo[48], grasa[62] y tejido nervioso[78] de pacientes en tratamiento con ITIAN y que presentaban miopatía, lipoatrofia y neuropatía respectivamente. Posteriormente los diferentes estudios han mostrado resultados inconsistentes en cuanto a la relación entre ADNmt y las manifestaciones típicas de toxicidad mitocondrial mediada por ITIAN. Por ejemplo, en casos de hiperlactacidemia y lipoatrofia, algunos estudios han demostrado correlación con los niveles de ADNmt en monocitos de sangre periférica[45, 79, 80], y que esta depleción era reversible al suspender el tratamiento, mientras que otros estudios no han evidenciado esta correlación[81-83].

En tejido graso también existen resultados contradictorios. Varios estudios han mostrado correlación entre el número de copias de ADNmt/célula y la presencia de lipoatrofia[61, 84], y un estudio en pacientes con lipoatrofia o neuropatía periférica ha evidenciado un descenso significativo de los niveles de ADNmt en las muestras de tejido adiposo, pero no en las de monocitos de sangre periférica[85]. Por el contrario, otro grupo que comparaba

pacientes con y sin lipoatrofia ha encontrado niveles significativamente menores de ADNmt en sangre periférica en los primeros, mientras que los niveles de ADNmt en tejido graso no diferían entre los dos grupos[80].

Por otro lado, también existen controversias en cuanto a la correlación entre ADNmt y función mitocondrial. Un estudio ha encontrado que la reducción de la masa mitocondrial y del contenido de ADNmt en células sanguíneas no se acompaña de disminución en la actividad de la citocromo oxidasa C, sugiriendo que existen mecanismos compensadores de la transcripción o traslación a nivel mitocondrial[86]. En otro estudio del mismo grupo la reducción de ADNmt en monocitos de sangre periférica sí se acompaña de disminución en la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria, aunque sin evidencia de disfunción mitocondrial a nivel de consumo de oxígeno o peroxidación de los lípidos[87]. Por tanto, aunque varios estudios han sugerido la existencia de una correlación positiva[87-89], parece prudente afirmar que con la literatura disponible no es posible todavía aclarar esta cuestión.

#### 5.1.2. Depleción de ARNmt. Evidencias clínicas

El genoma mitocondrial codifica 22 ARNs de transferencia (ARNt) y 2 ribosómicos (ARNr), todos ellos necesarios para la translación de 13 polipéptidos codificados en el ADNmt. Mutaciones en los genes del ARNt se han asociado con desórdenes neuromusculares y neurodegenerativos, que comparten características fenotípicas con algunos de los síntomas de toxicidad mitocondrial en pacientes con infección por el VIH[90, 91]. Cualquier daño directo al ADNmt ó cualquier tipo de inhibición de la transcripción podría afectar también a las moléculas de ARNmt, induciendo toxicidad mitocondrial por una nueva vía.

Un estudio llevado a cabo por Mallon *et al.* en adipocitos y monocitos de pacientes en tratamiento con AZT ó d4T ha demostrado una disminución en la expresión de genes mitocondriales, sin que ésta se acompañe de cambios significativos en los niveles de ADNmt ó en los parámetros metabólicos de función mitocondrial[92]. Todo ello sugiere que los ITIAN pueden interferir, directa o indirectamente, en la polimerización del ARNmt y en la regulación

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

de la expresión génica mitocondrial. Teniendo en cuenta que la síntesis o replicación del ADNmt es iniciada por ARN, la actividad de la polimerasa-y mitocondrial, que además tiene parcialmente actividad de transcriptasa reversa, resulta de una alta significación fisiológica[93]. Dicha actividad podría ser inhibida por los ITIAN. Otra diana potencial de los ITIAN sería la *polimerasa mitocondrial del ARN* en sí misma, y los co-factores necesarios para la transcripción, algunos de los cuales están regulados a través de la fosforilación[94]. Además, los ITIAN podrían interferir perjudicando la síntesis y/o utilización de los ribonucleótidos de forma similar a la hipotetizada para los nucleótidos.

#### *5.1.3. Daño directo al ADNmt. Evidencias clínicas*

Tan importante como la cantidad de ADNmt es la calidad del mismo. Se sabe que a lo largo del tiempo se acumulan mutaciones y deleciones que juegan un papel en las alteraciones asociadas a la edad[95].

La terapia con análogos de los nucleótidos ofrece unas condiciones permisivas para el desarrollo de mutaciones *in vivo* en el ADNmt en sangre periférica[96]. Además, los ITIAN y otros agentes oxidativos han mostrado ser capaces de dañar directamente el sistema de producción de energía de la mitocondria, ocasionando una disfunción en el control redox celular que puede llevar potencialmente a una pérdida de la integridad del ADNmt[97]

#### *5.1.4. Otros mecanismos de toxicidad mitocondrial mediados por los ITIAN*

Los ITIAN pueden producir desequilibrios en el *pool* celular y mitocondrial de nucleótidos y nucleósidos. Este efecto podría alterar un gran número de reacciones en cadena que requieren como sustrato a estas moléculas.

También se han sugerido otros mecanismos independientes del ADNmt, de los que aún se sabe poco. AZT puede producir a corto plazo (antes de que se observan cambios en los niveles de ADNmt) una reducción en el potencial de membrana mitocondrial[98], lo que sugeriría que dicho fármaco puede físicamente interferir en la estructura de la membrana mitocondrial. Zalcitabina puede producir una disminución en la producción de ATP, aumentar la formación de radicales libres y mediar daños celulares antes de que ocurran cambios en el ADNmt[99]. En otro estudio realizado



sobre grasa hepática los análogos de la timidina han demostrado aumentar la oxidación sin afectar al ADNmt, lo que jugaría un papel importante en el desarrollo de la lipopatía[100].

En la figura 4 se representan de forma esquemática los mecanismos descritos.

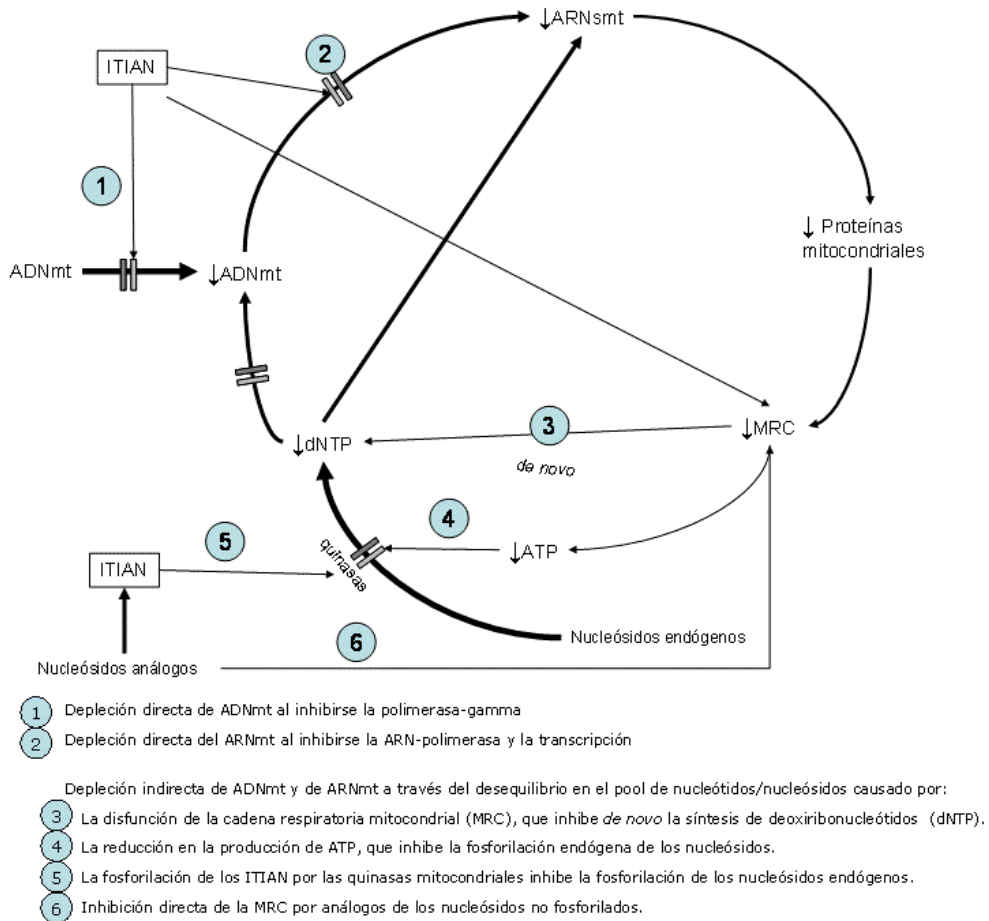


Figura 5.- Esquema de los potenciales mecanismos de toxicidad mitocondrial de los ITIAN

### 5.1.5. El círculo vicioso del daño mitocondrial

Con el paso del tiempo la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) daña al ADNmt. Además, la infección por el VIH per se es capaz de afectar a la función de la mitocondria por mecanismos diversos. Finalmente, los

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

ITIAN también dañan al ADNmt. Este daño acumulado ocasiona una disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial, lo que lleva a un estrés oxidativo, a la producción de radicales libres y a un nuevo daño sobre el ADNmt. Por tanto el tratamiento a largo plazo de los pacientes con infección por el VIH con terapias que incluyen ITIAN proporciona el contexto para un "triple insulto" a la mitocondria (figura 5). Se podría hipotetizar un modelo multifactorial y sinérgico para la toxicidad mitocondrial, que variaría en intensidad en función del tejido, de los fármacos y de las condiciones del individuo (comorbilidades y predisposición genética).

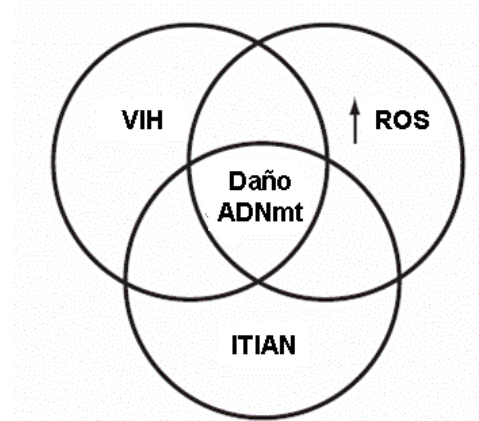


Figura 6.- Toxicidad acumulada sobre el ADNmt

Continúan siendo necesarios estudios longitudinales con poblaciones mayores para dilucidar los mecanismos de toxicidad mitocondrial mediada por ITIAN y su contribución relativa a la aparición de sintomatología clínica. Esto permitiría buscar los marcadores y los tejidos más relevantes para testar la toxicidad mitocondrial, con el objetivo de prevenir, predecir y monitorizar a los pacientes VIH en tratamiento antirretroviral.

## **5.2. Infección por el VIH y toxicidad mitocondrial**

### **5.2.1 Evidencias clínicas**

Numerosos estudios han demostrado niveles disminuidos de ADNmt en diferentes tejidos de pacientes con infección por el VIH que no recibían

tratamiento (*naïves*) frente a pacientes sin infección por el VIH[45, 62, 82, 101]. En biopsias musculares y nerviosas de pacientes *naïves* con miopatía o neuropatía asociada al VIH se ha demostrado la presencia de anomalías ultraestructurales en las mitocondrias, alteraciones en la cadena respiratoria y depleción de ADNmt[101]. Estas alteraciones son similares a las halladas en estudios *in vitro* de células musculares y nerviosas cultivadas con ITIAN. También en tejido adiposo de pacientes *naïves* se ha encontrado reducción en los niveles de ADNmt[45, 102]. En cuanto a la ratio ADNmt/ADNn medida en monocitos de sangre periférica, se han descrito diferencias estadísticamente significativas entre pacientes sanos no infectados por el VIH y pacientes *naïves* (reducción del 44% del ratio), diferencia que se incrementaba al comparar los primeros con pacientes VIH positivos en TAR e hiperlactacidemia (reducción del 78% de la ratio)[45].

#### 5.2.2 Mecanismos de daño mitocondrial mediados por el VIH

El VIH puede dañar la mitocondria por un mecanismo directo o a través de las citoquinas proinflamatorias liberadas en respuesta a su entrada en el organismo[103].

Varios productos proteicos del VIH han demostrado ser capaces de producir *in vitro* y en modelos animales daño mitocondrial y clínica derivada de ello. Por ejemplo, la expresión de la proteína transactivadora *Tat* puede provocar en ratones cardiomiopatía y destrucción de las mitocondrias[104]. La proteína viral R (*Vpr*) es inductora de la apoptosis celular por dos vías: por un lado suprime el potencial transmembrana actuando directamente sobre el poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), y por otro aumenta la liberación mitocondrial de proteínas apoptogénicas (citocromo C y factor inductor de la apoptosis)[105, 106]. La proteasa del VIH-1 también juega un papel pro-apoptótico al aumentar la liberación de citocromo C[107].

Las citoquinas deben jugar asimismo un papel fundamental, puesto que el VIH per se no afecta a las células musculares, nerviosas ni a los adipocitos. Los niveles de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  e interferón  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) están elevados en pacientes con infección por el VIH no tratada[108, 109], y

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

descienden con el inicio del TAR[110], aunque pueden persistir subgrupos de linfocitos CD8 con una elevada producción de TNF- $\alpha$ [111]. El TNF- $\alpha$  ha demostrado desencadenar la apoptosis celular a través de daño mitocondrial[112], y puede reducir los niveles y la calidad del ADNmt[113]. El IFN- $\alpha$  es una citokina pro-apoptótica cuyos efectos están mediados por la liberación de citocromo c mitocondrial y la alteración de la transcripción del ADNmt. Varios estudios han sugerido la asociación entre niveles elevados de TNF- $\alpha$  o de su receptor soluble tipo 2 y dislipemia, resistencia a la insulina y/o lipoatrofia[114-116], esta última asociada con algún grado de depleción de ADNmt en los adipocitos[62]. Niveles séricos elevados de IFN- $\alpha$  también se han asociado con lipoatrofia[117].

Por tanto, la infección por el VIH produce per se toxicidad a nivel mitocondrial. La introducción del TAR, y concretamente de los ITIAN, no hace sino agravar un daño estructural y genético preexistente y posiblemente infravalorado en los estudios *in vitro*[103].

### **5.3. Coinfección por el VHC y toxicidad mitocondrial**

Existen en el mundo unos 200 millones de personas infectadas por el virus de la hepatitis C (VHC). La prevalencia de coinfección VIH/VHC es muy variable. En regiones como el Sudeste de Europa, la costa Este de Norteamérica o el Sudeste Asiático, donde el uso de drogas por vía parenteral representa una de las principales conductas de riesgo, el porcentaje de individuos coinfectados por ambos virus es extremadamente alto[118].

La infección por el VHC se asocia con toxicidad mitocondrial[119], y en el contexto de la coinfección VIH/VHC este efecto puede verse realizado, tanto por la acción virológica directa como por la interacción entre los fármacos antirretrovirales y la ribavirina. Las manifestaciones clínicas derivadas del daño mitocondrial, como la hiperlactacidemia o la lipoatrofia, son por tanto más frecuentes entre personas coinfectadas por el VIH/VHC[120, 121].

### *5.3.1. Infección por el VHC y disfunción mitocondrial: aspectos fisiopatológicos*

Aunque la relación entre infección por el VHC y daño mitocondrial parece evidente, los mecanismos responsables siguen sin ser totalmente aclarados. Se postula como causa principal el estrés oxidativo persistente a nivel intracelular como consecuencia de la inflamación producida por el propio virus[122] y la activación de células proinflamatorias. Este aumento de radicales libres conduciría posteriormente a la disfunción mitocondrial.

Un segundo mecanismo sería el efecto directo de las proteínas virales sobre la mitocondria. Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la expresión de la proteína del core del VHC puede producir un daño oxidativo directo[123]. La activación inmuno-mediada de cascadas apoptóticas por el VHC constituye un tercer mecanismo. La expresión del receptor de muerte *Fas* es significativamente mayor en hepatocitos que expresan antígeno del core del VHC que en células no infectadas[124]. La proteína NS3 del VHC también es capaz de inducir la apoptosis a través de la cascada caspase-8[125].

Estudios ultraestructurales de biopsias hepáticas en pacientes infectados por el VHC, con y sin hepatocarcinoma, han mostrado anomalías a nivel mitocondrial[126]. Estas alteraciones son similares a las observadas en un grupo de 30 pacientes coinfectados por el VIH y el VHC y en tratamiento antirretroviral[127].

Existe evidencia de que se produce depleción de ADNmt en el hígado de personas coinfectadas en asociación con el uso de análogos de los nucleósidos. Por ejemplo, en un estudio el contenido de ADNmt hepático se redujo un 47% en pacientes coinfectados por el VIH/VHC que tomaban d4T, ddI ó ddC en comparación con aquellos no expuestos a estos ITIAN[128].

### *5.3.2. Coinfección VIH/VHC: manifestaciones clínicas de toxicidad mitocondrial*

La coinfección por el VHC incrementa la disfunción mitocondrial existente en la infección por el VIH y sus manifestaciones clínicas, tales como lipoatrofia, pancreatitis, neuropatía periférica, miopatía, hiperlactacidemia o acidosis láctica[120, 121]. Un estudio llevado a cabo en el Hospital Carlos III de Madrid demostró que la coinfección por el VHC y/o el VHB se asociaba con

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

una mayor reducción en el contenido de ADNmt en monocitos de sangre periférica que la monoinfección por el VIH[79]. Un estudio posterior más detallado mostró que la infección por el VHC podía producir por sí misma depleción en el ADNmt en sangre periférica, y que ésta era más pronunciada en pacientes que realizaban tratamiento con interferón pegilado más ribavirina para la hepatitis crónica[129].

La infección por el VHC también se asocia con la forma atrófica del síndrome de lipodistrofia observado en los pacientes infectados por el VIH, especialmente tras la exposición continuada a análogos de los nucleósidos. En una cohorte de 226 pacientes infectados por el VIH, la coinfección por el VHC fue significativamente más frecuente en pacientes lipoatróficos[121].

### *5.3.3. Coinfección VIH/VHC: interacciones farmacológicas.*

La combinación interferón pegilado (interferon-PEG, polimerizado con polietilenglicol) más ribavirina (un análogo del nucleósido guanosina) constituye hoy en día la terapia de elección para el tratamiento de la infección crónica por el VHC. La respuesta virológica sostenida que se obtiene con este tratamiento es menor en pacientes coinfectados por el VIH/VHC que en pacientes monoinfectados por el VHC[130, 131]. Aparte de la menor eficacia intrínseca de estos fármacos en el contexto de la infección por el VIH, la coadministración del TAR ocasiona un gran número de efectos adversos que llevan en muchas ocasiones a la suspensión prematura del tratamiento. Una de las interacciones más importantes es la de la ribavirina con el d4T ó el ddI, cuya base patogénica reside en un aumento de la toxicidad mitocondrial. Parece existir un efecto sinérgico entre la ribavirina y el d4T, que lleva a una rápida y severa pérdida de peso[120]. Además, se ha encontrado que tanto la pérdida de peso como las elevaciones de los niveles de lactato y amilasa son más pronunciados en pacientes que toman d4T ó ddI frente a aquellos que toman otros ITIAN más ribavirina.

El manejo de la coinfección VIH/VHC requiere por tanto considerar el alto riesgo de toxicidad mitocondrial de esta población. Las decisiones terapéuticas deben ir encaminadas a paliar esta situación en la medida de

lo posible. Además, dado el efecto deletéreo de la infección por el VHC en los pacientes con VIH, los esfuerzos para erradicar el VHC deben incrementarse y convertirse en prioritarios en el manejo de estos pacientes.

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

## **6.- INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL**

La medición de la función mitocondrial es un tema complejo, en el que se investiga desde hace tiempo. El desarrollo de una técnica sencilla y asequible permitiría monitorizar a los pacientes en tratamiento antirretroviral y prevenir el desarrollo de las manifestaciones clínicas de toxicidad mitocondrial. En los últimos años se han propuesto varias técnicas, basadas en diferentes mecanismos.

### **6.1. Métodos bioquímicos: función enzimática y consumo de oxígeno**

El análisis de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria y de cada una de las enzimas que los componen se puede realizar mediante espectrofotometría o técnicas polarográficas[132, 133]. Estas técnicas proporcionan medidas cuantitativas de actividad enzimática. El análisis de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) tiene la ventaja de proporcionar una medida de la función de la cadena respiratoria mitocondrial.

Varios estudios han demostrado alteraciones en la actividad enzimática y en la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria mitocondrial en adipocitos, miocitos, hepatocitos y células mononucleadas de sangre periférica de pacientes con infección por el VIH sometidos a tratamiento antirretroviral[87, 89, 134].

Sin embargo, el acceso a estos tejidos requiere en general la realización de una biopsia, lo que dificulta el uso de los métodos descritos para la monitorización de los pacientes. Además las técnicas bioquímicas no están estandarizadas por lo que la interpretación de los resultados es difícil.

### **6.2. Métodos genéticos**

Para medir las alteraciones del ADNmt se han desarrollado métodos cualitativos y cuantitativos.

#### **6.2.1. Métodos cualitativos**

Se basan en análisis secuenciales y constituyen el mejor método para identificar mutaciones específicas y grandes deleciones causantes de



enfermedades como la retinitis pigmentosa, encefalomiopatías mitocondriales, síndrome de Pearson, etc.[32]

### **6.2.2. Métodos cuantitativos**

Desde la introducción de la PCR en tiempo real la posibilidad de cuantificar el ADNmt ha pasado a ser una realidad sencilla y al alcance de cualquier laboratorio especializado en biología molecular. Se han descrito varios métodos basados en la detección de genes nucleares y mitocondriales. La ratio que se establece entre el ADN nuclear (ADNn) y el ADN mitocondrial (ADNmt) permite estimar el número total de copias de ADNmt por célula[45, 84, 135]. Basado en este principio se han comercializado diferentes kits de cuantificación de ADNmt. El contenido de plaquetas en sangre periférica (que contienen ADNmt pero no ADNn) puede interferir en las determinaciones de la ratio ADNmt/ADNn, por lo que lo ideal es eliminar las plaquetas antes de realizar la cuantificación[37, 38]. Sin embargo se considera que cuando el contenido de plaquetas es menor que cinco veces el número de polimorfonucleares los resultados apenas se afectan.

### **6.3. Limitaciones actuales y posibilidades futuras**

Por el momento no existen técnicas simples y no invasivas para evaluar la función mitocondrial en la práctica clínica habitual, y las técnicas que miden el contenido de ADNmt en sangre periférica pueden obviar aspectos importantes de la función mitocondrial.

La cuantificación mediante PCR en tiempo real presenta todavía varias limitaciones y cuestiones sin resolver. En primer lugar, algunos estudios señalan una variabilidad considerable en las determinaciones de ADNmt[136, 137], Por otro lado, las células mononucleadas de sangre periférica han sido el objeto de análisis más frecuente, pero este análisis puede no ser necesariamente indicativo de disminución del ADNmt en otros tejidos afectados por la toxicidad mitocondrial, como el tejido adiposo[80]. Es lógico esperar que los efectos de la toxicidad mitocondrial tengan en cierto modo un componente tejido-específico, que se plasme en una disminución del ADNmt que difiera según el tejido. Por ejemplo, estudios de disminución del ADNmt en pacientes lipodistróficos en TAR han indicado que un mismo paciente puede tener niveles marcadamente distintos de

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

ADNmt en tejido adiposo respecto a células mononucleadas de sangre periférica[80, 85]. Un tercer aspecto a considerar es la existencia del fenómeno de dintel típico de las patologías mitocondriales, por el cual sólo a partir de ciertos niveles de disminución del ADNmt éste empieza a tener efectos deletéreos para la célula. Los cambios en la cantidad de ADNmt que ocurran por encima de ese dintel pueden tener un escaso valor diagnóstico o pronóstico. Además, la normalidad funcional puede obtenerse mediante mecanismos de regulación metabólica compensadores[86]. El dintel puede ser distinto para cada tejido dentro de un mismo paciente, e incluso variar según el tipo de tratamiento. Estudios en adipocitos en cultivo han indicado que distintos ITIAN, pese a generar niveles similares de depleción de ADNmt, son permisivos o no para mecanismos de normalización compensatoria de la expresión génica del ADNmt[138]. Incluso no puede descartarse que exista una variabilidad individual entre los pacientes acerca de cuál es el dintel de ADNmt a partir del cual comienzan las alteraciones funcionales.

Así pues, la gran variabilidad a la que nos enfrentamos permite explicar el escaso valor predictivo de los valores de ADNmt en sangre periférica en relación con síntomas y signos de toxicidad mitocondrial[81].

Todo ello hace necesario el desarrollo futuro de nuevos test marcadores de toxicidad mitocondrial, rápidos, baratos y clínicamente aplicables, que estén más directamente relacionados con aspectos funcionales de la mitocondria y que permitan por tanto predecir la probabilidad de desarrollo de eventos de toxicidad mitocondrial con mayor fiabilidad. Mientras tanto, y a pesar de sus limitaciones, la cuantificación de la ratio ADNmt/ADNn es una herramienta sencilla y aplicable a la práctica clínica habitual.

## **II. HIPÓTESIS**

El uso de una pareja de ITIAN que no incluyan análogos de la timidina no provoca en pacientes que inician TAR una disminución significativa de la ratio ADNmt/ADNn como marcador precoz del desarrollo de toxicidad mitocondrial.

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

### **III. OBJETIVOS**

- Determinar si el uso de TAR basado en una pareja de ITIAN no análogos de la timidina influye en la depleción de la ratio ADNmt/ADNn en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable.
- Determinar los factores que influyen en la depleción de la ratio ADNmt/ADNn.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODO**

### ***1. Diseño y población:***

#### ***1.1. Diseño del estudio***

Estudio trasversal, descriptivo.

#### ***1.2. Población***

Se seleccionaron pacientes atendidos en el área de Consultas Externas de la UGC de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Reina Sofía, desde Febrero de 2006 a Enero de 2007.

El tamaño total de la muestra fue de 100 pacientes, repartidos del siguiente modo:

- Grupo de Estudio (A): 50 pacientes.
- Grupos Control (B y C): 25 pacientes en cada grupo.

Se adjudicaron a los 3 grupos según las siguientes características:

**a) Grupo de Estudio ó Grupo A:** Pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable de más de 2 años con una pareja de análogos que incluyera 3TC ó FTC + TNF/ABC/ddI. La situación clínica, virológica e inmunológica debía estar estable.

#### **Criterios de inclusión:**

- Pacientes mayores de 18 años.
- Infección confirmada por el VIH.
- Firmar el consentimiento informado.
- TAR estable desde hace más de dos años.
- Carga viral de VIH indetectable (<50 copias/ml) al menos durante los 12 meses previos a la inclusión en el estudio.
- Situación clínica e inmunológica estable.
- Adherencia al tratamiento superior al 90% (según informe de Farmacia).

#### **Criterios de exclusión:**

- Edad inferior a 18 años.
- Adherencia al TAR inferior al 90% en el último año.
- Carga viral de VIH detectable (>50 copias/ml) en dos determinaciones en los 12 meses previos a la inclusión en el estudio.
- Existencia de enfermedad aguda ó inestable.

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

- Consumo de drogas activo.
- Tratamiento concomitante para la infección por el VHC.

**b) Grupo Control B:** Pacientes infectados por el VIH y que nunca hubieran recibido TAR (*naïves*), coinfectados o no por el VHC.

Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años.
- Infección confirmada por el VIH.
- Firmar el consentimiento informado.
- No haber recibido nunca TAR.

Criterios de exclusión:

- Edad inferior a 18 años.
- Existencia de enfermedad aguda o inestable.
- Consumo de drogas activo.
- Tratamiento concomitante para la infección por el VHC.

**c) Grupo Control C:** Pacientes sin infección por el VIH, emparejados en edad, sexo y serología positiva o negativa para el VHC con el Grupo B.

Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años.
- Serología negativa para el VIH.
- Firmar consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Edad inferior a 18 años.
- Existencia de enfermedad aguda o inestable.
- Consumo de drogas activo.
- Tratamiento concomitante para la infección por el VHC.

## **2. Protocolo del estudio:**

Para cada uno de los pacientes incluidos en el estudio se recogieron las siguientes variables (ver Hoja de Recogida de Datos en el Anexo):

- Nº de identificación para el estudio, edad y sexo.
- Peso, talla e índice de masa corporal (IMC).

- Historia de infección por el VIH (fecha de diagnóstico, fecha de posible infección, vía de transmisión, estadio CDC, CD4 nadir, carga viral previa al comienzo del TAR y pauta de TAR elegida).
- Consumo actual de alcohol (g/día), tabaco (cigarrillos/día) u otras drogas (heroína, metadona, cannabis, cocaína).
- Coinfección por el VHB y/o VHC y carga viral más reciente.

Coincidiendo con la determinación analítica habitual en la que se solicitaba la determinación de ARN-VIH, subpoblaciones linfocitarias, hemograma, bioquímica con glucosa en ayunas, urea, creatinina, sodio, potasio, calcio, proteínas, albúmina, amilasa, transaminasas, GGT, FA, bilirrubina, colesterol total y fraccionado, triglicéridos, LDH y CK, se obtuvo una muestra de sangre adicional para determinar niveles de ratio ADNmt/ADNn.

### 3. Técnicas de laboratorio utilizadas

#### 3.1 Determinación de la ratio ADNmt/ADNn:

La extracción de ADN se realizó a partir de 500µL de sangre total EDTA-K<sub>3</sub>, utilizando un robot de extracción Magnapure (figura 7), de Roche Applied Science (RAS) y el kit indicado por el fabricante para sangre periférica. Esta metodología usa la captura de las moléculas de ADN mediante el método de micropartículas paramagnéticas, y eluye el extracto en un buffer de muy baja fuerza iónica, proporcionando de 200µL de ADN de alto peso molecular (unos 50.000bp), en solución acuosa y muy estable incluso a 4°C. Los ADN así obtenidos se conservaron a -20°C para su posterior procesado.

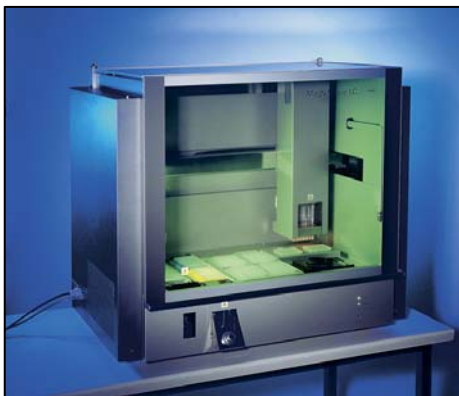


Figura 7.- MagnAPure



Figura 8.- LightCycler 1.5

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

Modificando un procedimiento de cuantificación publicado previamente[45], optimizado para su realización por PCR en tiempo real en un LigthCycler (RAS) mediante el empleo de cebadores y sondas FRET (figura 8), se optó por la omisión del uso de sondas (90% de los costes en oligonucleótidos) optimizando el procedimiento para su uso con SYBRGreen. El gen mitocondrial cuantificado (citocromooxidasa-c, subunidad I: CCOI) y el gen de referencia nuclear (subunidad accesoria de la polimerasa gamma humana: ASPOLG) amplifican con eficiencia muy similar en las condiciones alcanzadas con SYBRGreen.

Las reacciones de PCR en tiempo real fueron realizadas por duplicado y en tubos separados para los genes medido y de referencia. Dichas reacciones contenían 0,5µM de cada cebador, 4mM de MgCl<sub>2</sub>, 4µL de LightCycler FastStart SYBRGreen DNA master (RAS) reconstituida según las indicaciones del kit, 5µL de DNA y agua hasta completar el volumen total (20µL). Las secuencias de los cebadores utilizados fueron:

CCOI	forward	5'	TTCGCCGACCGTTGACTATT	3'
	reverse	5'	AAGATTATTACAAATGCATGGGC	3'
ASPOLG	forward	5'	GAGCTGTTGACGGAAAGGAG	3'
	reverse	5'	CAGAAGAGAATCCCGGCTAAG	3'

El esquema de termociclado se expone en la tabla siguiente:

<i>Programa</i>	<i>Ciclos</i>		<i>T<sup>a</sup></i>	<i>Tiempo</i>	<i>Detección</i>
Preamplificación	1		95°C	10min	No detec
Amplificación	45	Desnat.	95°C	5seg	No detec
		Annealing	60°C	10seg	No detec
		Elongación	72°C	5seg	Detec.
Melting	1	Desnat.	95°C	30seg	No detec
		Naturalizac.	40°C	30seg	No detec
		Desnat. lenta	Subiendo hasta a 85°C a 0,2°C/seg		Detección continua



Se registró la fluorescencia producida al final de cada ciclo de elongación. Al final del termociclado, se procedió a hacer un registro de la temperatura de *melting* de los productos generados, para detectar la presencia de dímeros de cebador, que tienen una temperatura de *melting* propia y diferente de los productos normales (figura 9).

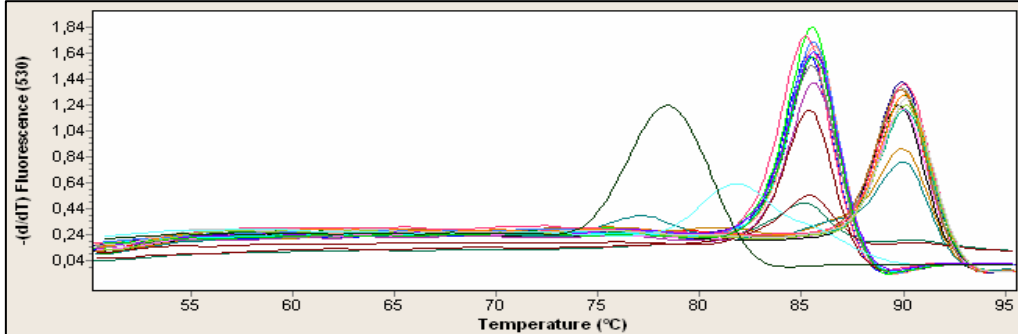


Figura 9.- Melting

En cada *run* se incluyó una misma muestra, por duplicado, procedente de un pool de ADN de personas sanas y que no tomaban ningún fármaco, a la que se realizó el mismo tratamiento y que sirvió como calibrador para normalizar las cuantificaciones *run* a *run*, según el algoritmo  $(Cp_{target}/Cp_{ref})$ , normalizando el resultado a 1 con la mediana de todos los valores obtenidos. Cp hace referencia al "crossing point" o ciclo en el que se empieza a diferenciar la señal producida del ruido de fondo (figura 10), dato proporcionado por el software del equipo (se eligió el método automático de la 2ª derivada de la fluorescencia).

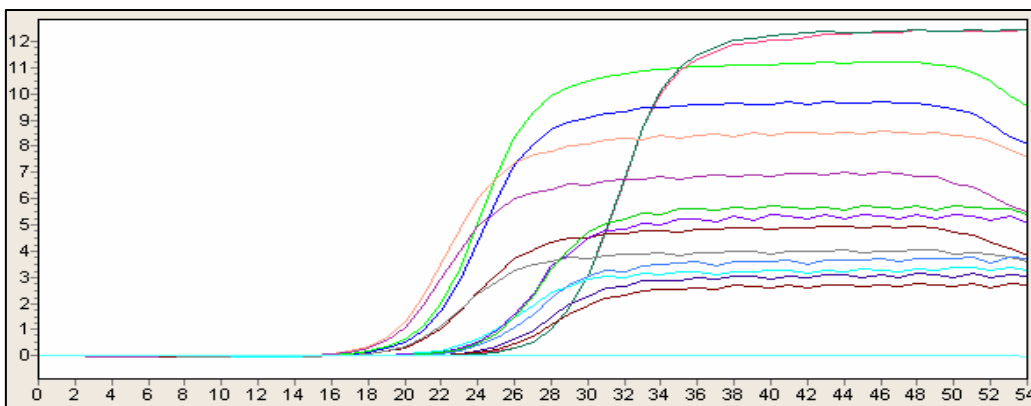


Figura 10.- Curvas de amplificación

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

Dado que las condiciones de Mg son muy similares a las del kit LightCycler DNA master SYBRGreen plus (con concentración fija de Mg)(RAS), optamos por utilizarlo (se ahorra un paso de pipeteo), sin encontrar menoscabo de la eficiencia de las reacciones en las condiciones de amplificación elegidas. Además, se programó el instrumento MagNaPure, con el que se realizó la extracción de ADN, para que llevara a cabo las labores de pipeteo y alicuotado de las "mastermixes" en los capilares (procedimiento de postelución), evitando así problemas originados por el pipeteo manual repetitivo. El esquema de pipeteo fue:

Capilar 1	Calibrador CCOI
Capilar 2	Replicado de 1
Capilar 3	Calibrador ASPOLG
Capilar 4	Replicado de 3
Capilar 5	Problema 1 CCOI
Capilar 6	Replicado de 5
Capilar 7	Problema 1 ASPOLG
Capilar 8	Replicado de 7
.../...	.../...
Capilar 29	Blanco CCOI
Capilar 30	Blanco ASPOLG

El uso de un calibrador (el mismo siempre) en cada *run*, evitó la necesidad de incorporar a cada experimento una curva de calibración y permitió realizar la cuantificación relativa de 6 en 6 pacientes. ( $1 \times 4 + 6 \times 4 + 2 \times 1 = 30$  capilares).

### *3.2 Determinación de los niveles de linfocitos CD4*

Ésta se hizo mediante citometría de flujo, técnica por la que se analizan células en suspensión que interfieren de forma individual con una fuente de luz. La intersección de cada célula con la luz láser provoca la emisión de una serie de señales luminosas que permite diferenciar poblaciones celulares dentro de la muestra analizada, por su tamaño relativo, por sus granulaciones o bien por su reactividad con fluorocromos previa incubación con diversos anticuerpos monoclonales. Es un método de lectura rápido y permite analizar un elevado número de células (de 10.000 a 50.000 para cada anticuerpo

monoclonal). Los datos generados por el citómetro de flujo son presentados de forma instantánea en una pantalla y almacenados en un ordenador para su análisis.

### *3.3 Determinación de la carga viral del VIH*

Para nuestro estudio se expresó la carga viral en plasma en forma de copias/mL, utilizando el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (prueba Amplicor HIV-1 Monitor<sup>®</sup>, versión 1.5 Roche Diagnostic) con un límite de detección inferior de 50 copias/mL. Éste es un método de amplificación in vitro de ácidos nucleicos para la cuantificación del ARN del VIH-1 en el plasma humano.

## **4. Estudio estadístico**

Los datos fueron introducidos codificados, introducidos y analizados en el programa SPSS<sup>®</sup>, versión 13.0 para Windows y se utilizó el paquete Microsoft Office XP.

Se realizaron regresiones lineales simples para establecer la relación de cada una de las variables potencialmente predictoras de disminución de la ratio ADNmt/ADNn. Independientemente de la significación estadística obtenida en el análisis univariante y teniendo en cuenta sólo la importancia clínica de las mismas, las variables introducidas en el modelo de Regresión lineal Múltiple (RLM) fueron las siguientes: edad (años), sexo, infección por el VIH, existencia de tratamiento antirretroviral, tratamiento con IPs, tratamiento con ITINAN, tratamiento con una pareja de ITIAN que incluyera didanosina (ddI), tratamiento con una pareja de ITIAN que incluyera tenofovir (TNF) e infección por el VHC, todas estas categorizadas (Sí, No). Por medio del estadístico T, las variables con una  $p \geq 0,15$  fueron una a una eliminadas del modelo (procedimiento de selección metódica), la comparación del modelo reducido con el modelo que incluye las variables eliminadas se realizó mediante la prueba parcial de F múltiple. Se estudiaron las posibles interacciones entre las variables del modelo. Las variables con una significación superior a 0,05 fueron estudiadas como posibles factores de confusión, considerándolas como tales si el porcentaje de cambio de los coeficientes era mayor al 15%. La colinealidad entre las variables independientes se valoró mediante el factor de

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*  
inflación de la varianza (FIV). Como prueba diagnóstica de casos extremos se utilizó la distancia de Cook.

## **V. RESULTADOS**

### **1. Análisis descriptivo**

#### **1.1. Grupo A: Pacientes infectados por el VIH y con TAR**

En la tabla siguiente se muestran las características basales demográficas y clínicas de los pacientes del Grupo A (N=50).

<b>Sexo</b> <sup>1</sup>	Hombre	34 (68%)
	Mujer	16 (32%)
<b>Edad (años)</b> <sup>2</sup>		42,06 (5,27)
<b>IMC</b> <sup>2</sup>		24,76 (4,09)
<b>Coinfección por el VHC</b> <sup>1</sup>		30 (60%)
<b>Diabetes</b> <sup>1</sup>		2 (4%)
<b>Fumador</b> <sup>1</sup>		35 (71,1%)
<b>Bebedor (&gt;40g/d)</b> <sup>1</sup>		2 (4%)

<sup>1</sup>Expresado como N (%)

<sup>2</sup>Expresado como media (DS)

Tabla 5.- Características basales del grupo A

Ningún paciente presentaba coinfección por el VHB.

La encuesta sobre consumo de tóxicos (cannabis, cocaína, heroína,...) no reveló ningún dato de interés. 7 pacientes (14%) se encontraban en tratamiento con Metadona.

En cuanto a los valores analíticos, 4 pacientes (8%) presentaron hiperlactacidemia, todos ellos asintomáticos. Los niveles medios de hemoglobina, leucocitos, plaquetas, glucosa, creatinina, CK, AST, bilirrubina, amilasa, colesterol total y fraccionado y triglicéridos fueron normales.

En la tabla siguiente se muestran los datos relativos a la historia de infección por el VIH de los pacientes del Grupo A:

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

<b>Vía de transmisión<sup>1</sup></b>	UDVP	25 (50%)
	Sexual	25 (50%)
<b>Años de infección<sup>2</sup></b>		10,99 (4,43)
<b>Estadío CDC<sup>1</sup></b>	A	25 (50%)
	B	9 (18%)
	C	16 (32%)
<b>CD4 nadir<sup>3</sup></b>		175 (64-268)
<b>Años de TAR<sup>2</sup></b>		3,42 (1,34)
<b>Tipo de TAR<sup>1</sup></b>	Pareja de ITIAN	
	- 3TC/FTC+ddI	26 (52%)
	- 3TC/FTC+TNF	21 (42%)
	- 3TC/FTC+ ABC	3 (6%)
	3 <sup>er</sup> fármaco	
	- ITINAN	30 (60%)
- IP	20 (40%)	
<b>CD4 actuales<sup>3</sup></b>		538 (376-713)

<sup>1</sup> Expresado como N (%)

<sup>2</sup> Expresado como media (DS)

<sup>3</sup> Expresado como Me (Q<sub>1</sub>, Q<sub>3</sub>)

Tabla 6.- Historia de infección por el VIH del Grupo A

### 1.2. Grupo B: Pacientes infectados por el VIH y sin TAR (naïves)

La tabla siguiente muestra las características basales demográficas y clínicas de los pacientes del Grupo B (N=25).

<b>Sexo<sup>1</sup></b>	Hombre	17 (68%)
	Mujer	8 (32%)
<b>Edad (años)<sup>2</sup></b>		37,92 (7,33)
<b>IMC<sup>2</sup></b>		25,35 (4,98)
<b>Coinfección por el VHC<sup>1</sup></b>		15 (60%)
<b>Diabetes<sup>1</sup></b>		3 (12%)
<b>Fumador<sup>1</sup></b>		17 (68%)
<b>Bebedor (&gt;40g/d)<sup>1</sup></b>		2 (8%)

<sup>1</sup> Expresado como N (%)

<sup>2</sup> Expresado como media (DS)

Tabla 7.- Características basales del Grupo B

Dos pacientes (8%) presentaban infección activa por el VHB (antígeno de superficie positivo).

La encuesta sobre consumo de tóxicos (cannabis, cocaína, heroína,...) no reveló ningún dato de interés. 7 pacientes (28%) se encontraban en tratamiento con Metadona.

Los datos más relevantes de la historia de infección por el VIH de los pacientes *naïves* se resumen en la tabla 8:

<b>Vía de transmisión<sup>1</sup></b>	UDVP	8 (32%)
	Sexual	16 (64%)
	Trasfusión	1 (4%)
<b>Años de infección<sup>2</sup></b>		5,81 (4,91)
<b>Estadio CDC<sup>1</sup></b>	A	18 (72%)
	B	7 (28%)
<b>CD4 nadir<sup>3</sup></b>		297 (174-715)
<b>CD4 actuales<sup>3</sup></b>		321 (201-388)
<b>CV-VIH actual</b>		17.900 (4.700-51.250)

<sup>1</sup> Expresado como N (%)

<sup>2</sup> Expresado como media (DS)

<sup>3</sup> Expresado como Me (Q<sub>1</sub>, Q<sub>3</sub>)

Tabla 8.- Historia de infección por el VIH del Grupo B

Sólo un paciente (4%) presentó hiperlactacidemia asintomática.

Los niveles medios de hemoglobina, leucocitos, plaquetas, glucosa, creatinina, CK, AST, bilirrubina, amilasa, colesterol total y fraccionado y triglicéridos fueron también normales.

### 1.3. Grupo C: Pacientes sin infección por el VIH

Las características basales demográficas y clínicas de los pacientes del Grupo C (N=25) fueron las siguientes:

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

<b>Sexo</b> <sup>1</sup>	Hombre Mujer	17 (68%) 8 (32%)
<b>Edad (años)</b> <sup>2</sup>		38,16 (10,42)
<b>IMC</b> <sup>2</sup>		25,72 (4,01)
<b>Infección por el VHC</b> <sup>1</sup>		15 (60%)
<b>Diabetes</b> <sup>1</sup>		1 (4%)
<b>Fumador</b> <sup>1</sup>		17 (68%)
<b>Bebedor (&gt;40g/d)</b> <sup>1</sup>		2 (8%)

<sup>1</sup> Expresado como N (%)

<sup>2</sup> Expresado como media (DS)

Tabla 9.- Características basales del Grupo C

Ningún paciente presentaba coinfección por el VHB.

La encuesta sobre consumo de tóxicos no reveló ningún dato de interés, salvo que 2 pacientes (8%) se encontraban en tratamiento con Metadona.

En cuanto a los valores analíticos, sólo 1 paciente (4%) presentó hiperlactacidemia leve y asintomática. El resto de valores analíticos estuvieron dentro de la normalidad.



## 2. Análisis univariante

### 2.1. Influencia del sexo

La comparación de la ratio normalizada ADNmt/ADNn entre hombres y mujeres no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,123$ ). La diferencia de medias fue de  $-0,045$  (IC  $0,012$  a  $-0,102$ ).

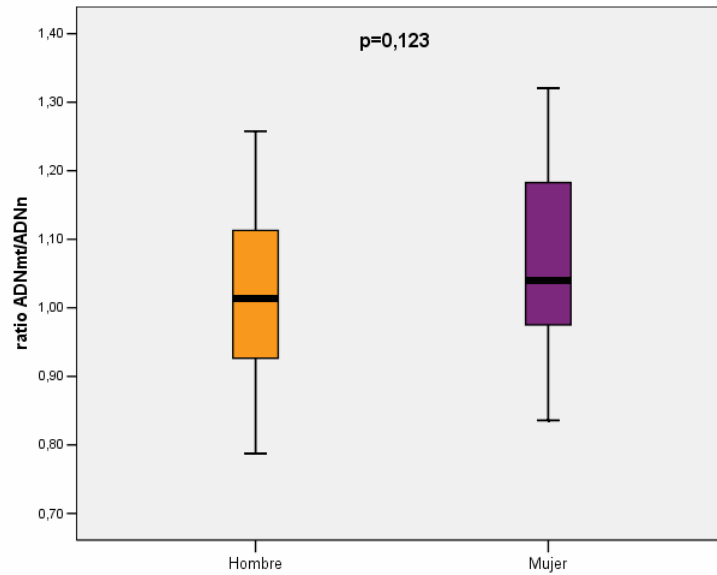


Figura 11.- Análisis univariante: Hombres vs mujeres

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

## 2.2. Influencia del VIH

La comparación de la ratio normalizada ADNmt/ADNn entre pacientes infectados por el VIH sin TAR (*naïves*) y pacientes no infectados por el VIH, excluyendo en ambos casos a los infectados por el VHC, mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,000$ ). La diferencia de medias fue de  $-0,187$  (IC  $-0,268$  a  $-0,105$ ).

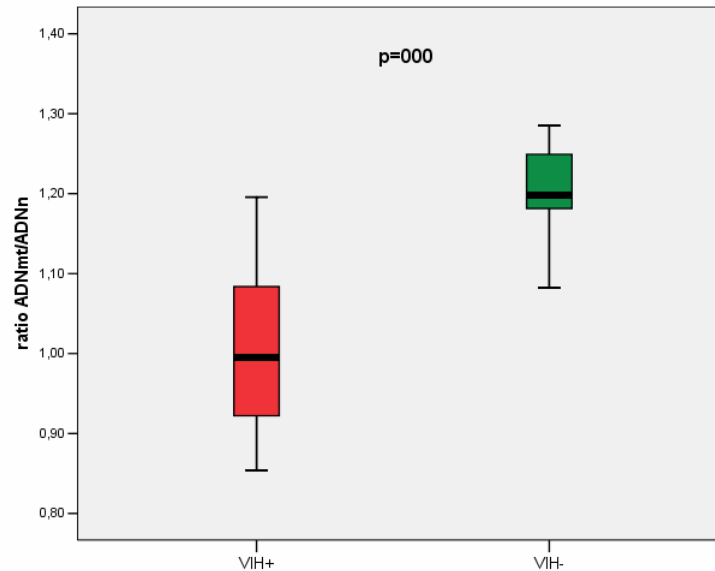


Figura 12.- Análisis univariante: VIH+ vs VIH-

Al comparar la ratio normalizada ADNmt/ADNn entre pacientes infectados por el VIH sin TAR (*naïves*) y pacientes no infectados por el VIH (sin excluir a los infectados por el VHC) también aparecieron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,009$ ). La diferencia de medias fue de  $-0,101$  (IC  $-0,174$  a  $-0,027$ ).

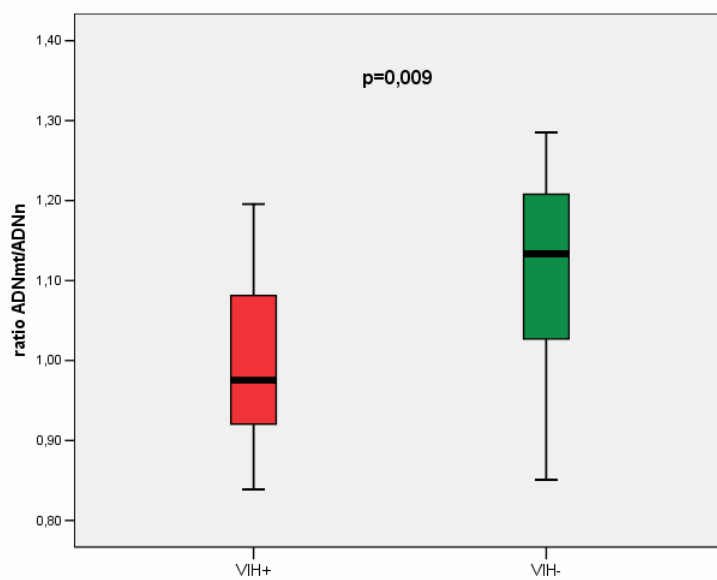


Figura 13.- Análisis univariante: VIH+ vs VIH- (incluyendo coinfectados por el VHC)

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

### 2.3. Influencia del TAR

La comparación de la ratio normalizada ADNmt/ADNn entre pacientes infectados por el VIH en TAR y pacientes *naïves* no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,973$ ). La diferencia de medias fue de  $-0,001$  (IC  $0,060$  a  $-0,062$ ).

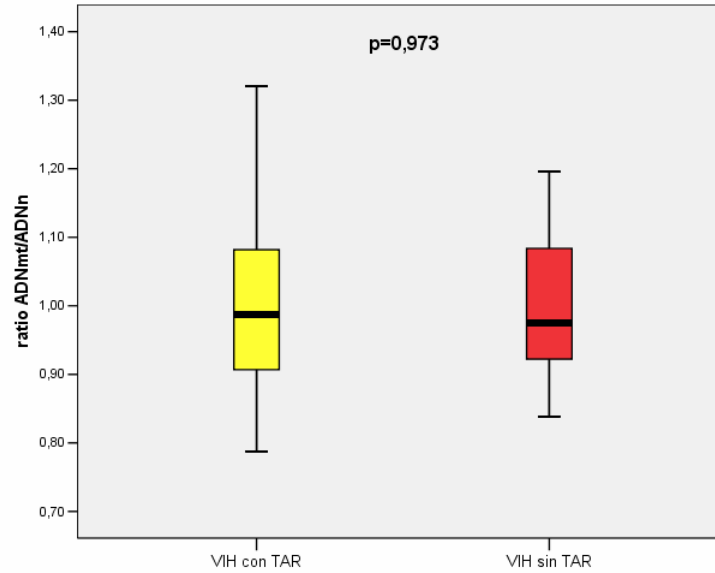


Figura 14.- Análisis univariante: VIH con TAR vs VIH *naïves*

Tal y como se muestra en la tabla siguiente, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ADNmt entre los pacientes *naïves* y los pacientes en tratamiento antirretroviral, estuviera éste basado en IP ó en ITINAN como terceros fármacos.

	Diferencia de medias	p
<b>Naïves vs TAR</b>	$-0,001$ (IC $0,060$ a $-0,062$ )	$0,973$
<b>Naïves vs TAR basado en IPs</b>	$0,032$ (IC $-0,051$ a $0,117$ )	$0,440$
<b>Naïves vs TAR basado en ITINAN</b>	$-0,020$ (IC $-0,084$ a $0,044$ )	$0,538$

Tabla 10.- Análisis univariante: VIH *naïves* vs VIH con TAR (basado en IP ó ITINAN)

Dentro del Grupo A (infectados por el VIH y en TAR), la comparación entre pacientes en tratamiento con IP (N=20) y pacientes en tratamiento con ITINAN (N=30) tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas

( $p= 0,528$ ). La diferencia de medias fue de  $-0,023$  (IC  $0,049$  a  $-0,094$ ).

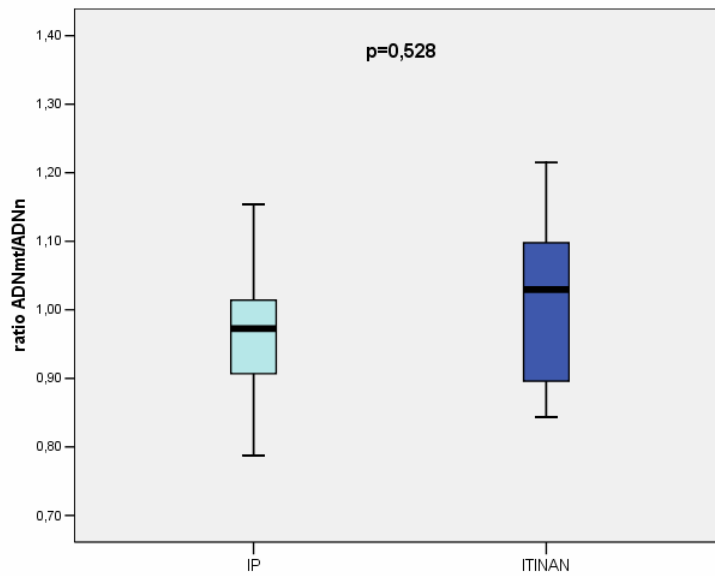


Figura 15.- Análisis univariante: IP vs ITINAN

La comparación entre pacientes que tenían en su pareja de ITIAN didanosina (ddI) frente a los que tenían tenofovir (TNF) sí mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,008$ ), con una diferencia de medias de  $0,089$  (IC  $0,024$  a  $0,154$ ).

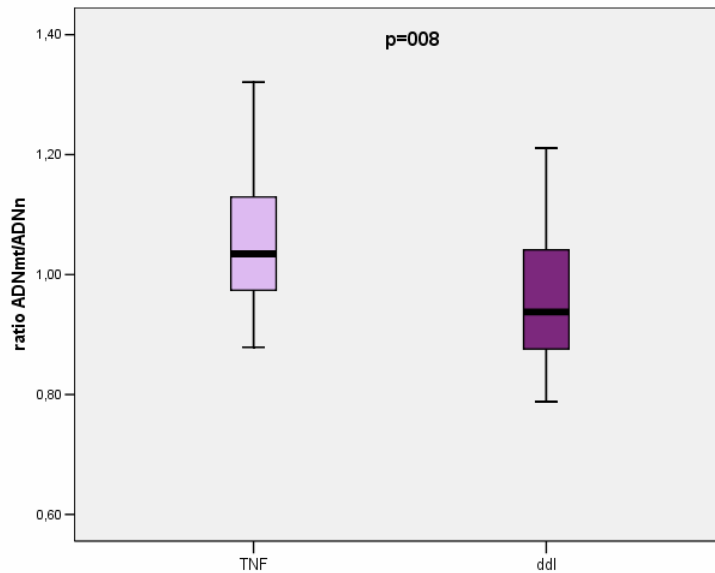


Figura 16.- Análisis univariante: TNF vs ddi

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

#### 2.4. Influencia del VHC

La comparación dentro del Grupo C (pacientes sin infección por el VIH) de la ratio normalizada ADNmt/ADNn entre pacientes infectados por el VHC y pacientes no infectados mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,001$ ). La diferencia de medias fue de 0,153 (IC 0,066 a 0,240).

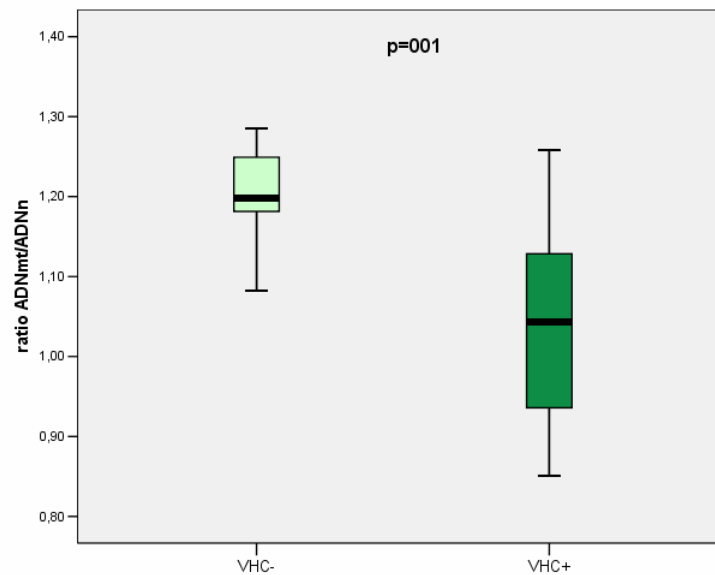


Figura 17.- Análisis univariante: VHC+ vs VHC-

Dentro del grupo de pacientes infectados por el VIH *naives*, la comparación de la ratio ADNmt/ADNn entre pacientes coinfectados o no por el VHC no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,865$ ). La diferencia de medias fue de 0,009 (IC -0,105 a 0,124).

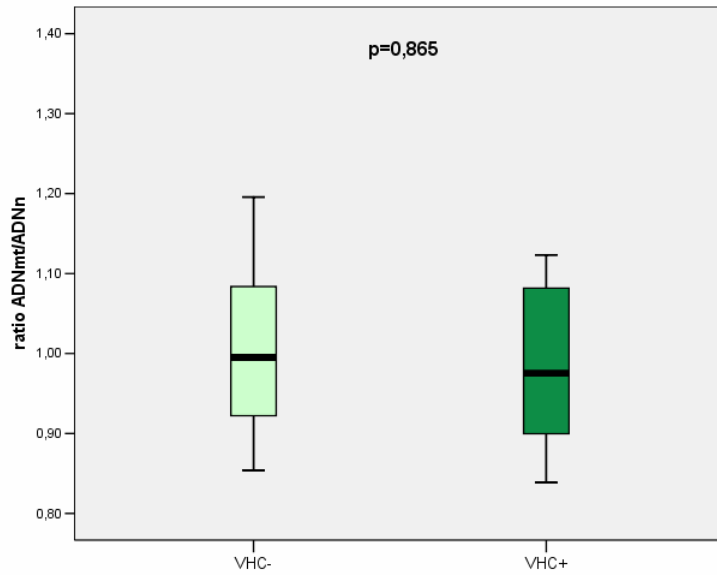


Figura 18.- Análisis univariante: VIH+/VHC+ vs VIH+/ VHC-

Dentro del grupo de pacientes infectados por el VIH y en TAR (Grupo A), la comparación de la ratio ADNmt/ADNn entre pacientes coinfectados o no por el VHC no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,957$ ). La diferencia de medias fue de 0,002 (IC -0,069 a 0,073).

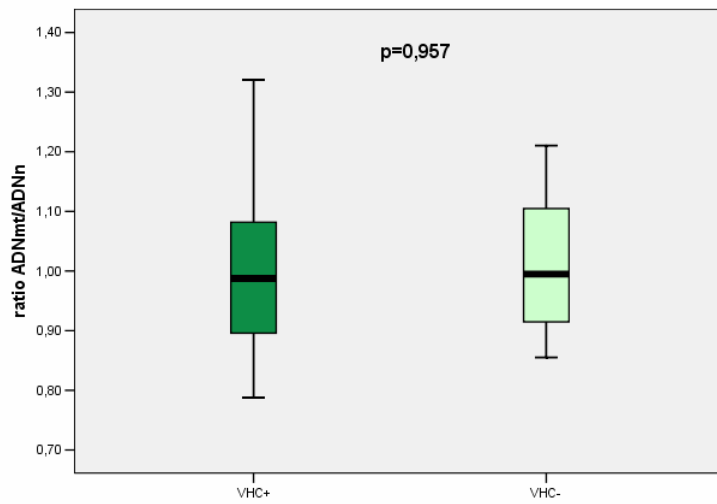


Figura 19.- Análisis univariante: VIH en TAR/VHC+ vs VIH en TAR/VHC-

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

### 2.5. Influencia de la coinfección VIH/VHC

La comparación de la ratio normalizada ADNmt/ADNn entre pacientes coinfectados por el VIH y el VHC y pacientes mono infectados por el VHC no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,399$ ). La diferencia de medias fue de  $-0,043$  (IC  $0,060$  a  $-0,146$ ).

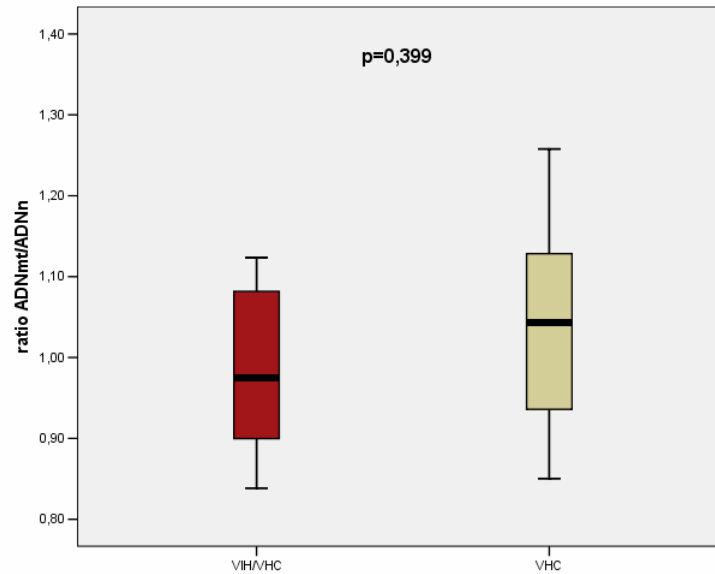


Figura 20.- Análisis univariante: VIH+/VHC+ vs VIH-/VHC+

En la siguiente figura se puede observar la influencia que ejercen sobre los niveles de ADNmt las diferentes combinaciones posibles entre el VIH y el VHC:



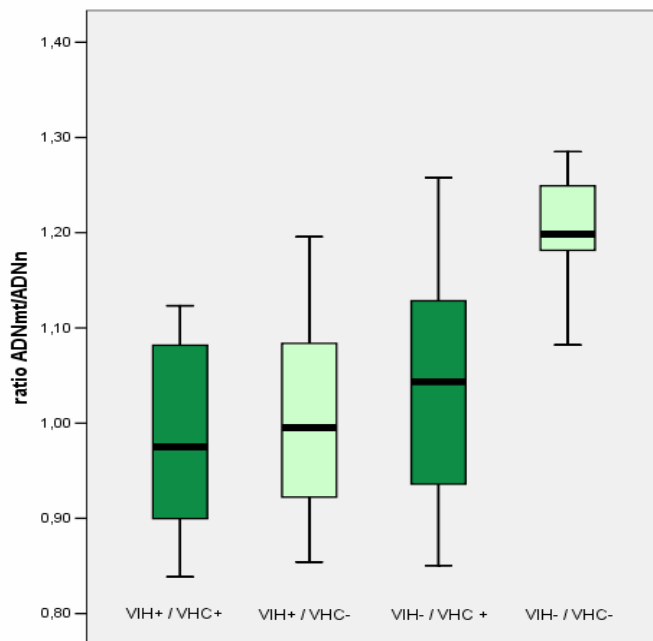


Figura 21.- Esquema de ratio ADNmt/ADNn según combinaciones entre VIH y VHC

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

## 2.6. Análisis univariante: tabla de resultados

En la tabla siguiente se muestran los resultados del análisis univariante realizado a la población total (N=100), tomando como variable dependiente la ratio ADNmt/ADNn.

### ANÁLISIS UNIVARIANTE

	$\beta$	IC (95%)	Sig*
<b>Edad</b>	-0,001	(-0,005, 0,002)	0,563
<b>Sexo</b>	0,045	(-0,012, 0,102)	0,123
<b>Infección por el VIH</b>	-0,101	(-0,158, -0,044)	<b>0,001</b>
<b>TAR</b>	-0,051	(-0,103, 0,000)	0,052
<b>Tratamiento con IPs</b>	0,010	(-0,059, 0,078)	0,781
<b>Tratamiento con ITINAN</b>	-0,055	(-0,112, 0,003)	0,062
<b>Tratamiento con ddI</b>	-0,092	(-0,149, -0,035)	<b>0,002</b>
<b>Tratamiento con TNF</b>	0,027	(-0,034, 0,089)	0,382
<b>Infección por el VHC</b>	-0,042	(-0,095, 0,011)	0,123

\* Significación estadística basada en el análisis de regresión lineal. Variable dependiente: ratio DNAm/DNA

Tabla 11.- Análisis univariante. Variable dependiente: ratio ADNmt/ADNn.

### 3. Análisis multivariante

Las variables incluidas en el modelo final de regresión múltiple fueron: infección por el VIH, tratamiento con IP, tratamiento con ddI e infección por el VHC.

Prueba parcial de F múltiple:  $F = 1,33$ ;  $p = 0,265$ ,  $Gl = (4, 87)$

Se valoraron todas las posibles interacciones resultando significativa la existente entre la infección por el VIH y la infección por el VHC, por lo que se incluyó en el modelo.

Siguiendo el criterio de la distancia de Cook no se identificaron pacientes con valores extremos.

En la tabla siguiente se muestran los resultados:

#### ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE

	$\beta$	IC (95%)	Sig
<b>Infección por el VIH</b>	Si VHC(-): -0,334 Si VHC(+): -0,181	(-0,517, -0,151) (-0,267, -0,094)	<b>0,000</b>
<b>Infección por el VHC</b>	Si VIH(-): -0,306 Si VIH(+): -0,153	(-0,501, -0,112) (-0,246, -0,060)	<b>0,002</b>
<b>Tratamiento con IPs</b>	0,074	(0,008, 0,139)	<b>0,028</b>
<b>Tratamiento con ddI</b>	-0,087	(-0,145, -0,028)	<b>0,004</b>

Coeficiente de determinación =  $R^2 = 0,236$ .

Análisis de varianza para la regresión:  $F = 7,117$ ;  $p = 0,000$

Tabla 12.- Análisis multivariante de regresión lineal múltiple

Según los resultados del análisis multivariante se podría predecir la ratio ADNmt/ADNn que tendría una persona conociendo las variables "VIH" (sí o no), "VHC" (sí o no), "ddI" e "IP" (estos últimos de forma continuada en los últimos 2 años) en función de la siguiente ecuación:

#### ECUACIÓN DE REGRESIÓN MÚLTIPLE

$$\text{ratio DNAm}/\text{DNAn} = 1,700 - 0,334(\text{VIH}) - 0,306(\text{VHC}) - 0,087(\text{ddI}) + 0,074(\text{IP}) + 0,153(\text{VIH y VHC})$$

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

## **VI. DISCUSIÓN**

Nuestro estudio demuestra cómo el origen de la toxicidad mitocondrial en pacientes infectados por el VIH es multifactorial. El conocimiento de este hecho es de gran importancia a la hora de poner en marcha estrategias preventivas para evitar su desarrollo y modificaciones terapéuticas para revertirlo. Como discutiremos más adelante, en su desarrollo puede jugar un importante papel tanto el tratamiento antirretroviral como el propio VIH y, en ocasiones, otros virus que con frecuencia afectan a los pacientes infectados por el VIH al compartir sus mecanismos de transmisión, como el VHC.

El efecto que la toxicidad mitocondrial juega en la evolución de los pacientes infectados por el VIH es de gran importancia. En primer lugar puede provocar alteraciones metabólicas que condicionan el desarrollo de una gran variedad de complicaciones. La acidosis láctica es la manifestación más grave de disfunción mitocondrial, aunque sus formas de expresión clínica pueden ser muy variadas incluyendo miocardiopatía, neuropatía periférica, pancreatitis o toxicidad hematológica. Los agentes causales clásicamente descritos son los ITIAN análogos de la timidina, los cuales por mecanismos complejos provocan una disfunción mitocondrial que impide cubrir las necesidades energéticas de tejidos altamente dependientes del abastecimiento de ATP.

Por otro lado la toxicidad mitocondrial puede provocar alteraciones en la morfología de los pacientes que ocasionan problemas relacionados con su propia imagen y que pueden tener un efecto estigmatizador. Todo ello puede tener como resultado final el abandono del tratamiento. La lipoatrofia es una de las manifestaciones clínicas del síndrome de lipodistrofia o alteración en la distribución de la grasa corporal. La lipoatrofia tiene una prevalencia del 16-29% después de 3 años de TAR[139, 140]. Está estrechamente relacionada con el uso de ITIAN, en particular de d4T [57-60]. Diversos grupos han comunicado un descenso en el contenido de ADNmt en pacientes con lipoatrofia[61-64], así como anomalías estructurales mitocondriales sugestivas de disfunción[65]. El manejo de los pacientes con lipoatrofia es controvertido. Varios estudios independientes

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

han demostrado que la sustitución de los análogos de la timidina por otros ITIAN menos tóxicos (ABC ó TNF) o por una terapia libre de ITIAN puede ser beneficiosa, aunque el efecto de esta medida es lento y parcial[69, 70, 141].

Prevenir el desarrollo de las manifestaciones clínicas asociadas a toxicidad mitocondrial puede ser muy beneficioso para los pacientes, ya que la mayoría de éstas manifestaciones clínicas, especialmente las morfológicas, tienen un tratamiento poco satisfactorio una vez instauradas y, como sucede con la lipoatrofia, son difícilmente reversibles. Por ello sería de gran utilidad poder disponer de marcadores precoces de desarrollo de toxicidad mitocondrial que fueran sensibles, fáciles de aplicar y utilizables en el seguimiento de los pacientes en la práctica clínica habitual. Entre las posibles herramientas a utilizar para este cometido la más contrastada es el estudio de la ratio ADNmt/ADNn.

En nuestro estudio hemos utilizado la medición de la ratio ADNmt/ADNn en células mononucleadas de sangre periférica porque es un método fiable y reproducible. Hemos empleado un procedimiento de cuantificación mediante PCR en tiempo real descrito previamente [45], que ha sido avalado por estudios posteriores[31, 36, 77, 79, 129, 142]. Hemos realizado cada reacción por duplicado y la determinación de cada uno de los genes en tubos separados porque se ha demostrado que este proceder aumenta la fiabilidad de los resultados [45].

Es cierto que los efectos de la toxicidad mitocondrial pueden tener un componente tejido-específico, que se plasme en una disminución del ADNmt que difiera según el tejido analizado[80, 85]. Esta puede ser una limitación de nuestro estudio. Aunque diversos estudios postulan la utilidad de estudiar directamente la toxicidad mitocondrial en tejido adiposo o hepático, los métodos empleados en esos casos son métodos invasivos, no exentos de riesgo, a veces fatales que los hacen difícilmente aplicables a la práctica clínica habitual.

La utilización de técnicas de imagen como la ecografía, el escáner DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry), la tomografía o la resonancia magnética ha servido para medir la composición grasa de determinadas regiones corporales. El mayor inconveniente de estos métodos es que no servirían como marcadores predictivos de riesgo de desarrollo de alteraciones morfológicas, sino que serían útiles para el diagnóstico de estas alteraciones una vez producidas y por tanto una vez que son difícilmente reversibles. Un inconveniente adicional de estas técnicas es su falta de estandarización.

Hasta el momento no existen técnicas simples y no invasivas para evaluar la función mitocondrial en la práctica clínica habitual. Aún considerando que la cuantificación del ADNmt en sangre periférica puede tener limitaciones a la hora de medir la función mitocondrial, esta técnica puede constituir una opción eficiente para el seguimiento clínico de los pacientes.

En los criterios de selección de nuestro estudio hemos excluido a aquellos pacientes que se encontraban recibiendo tratamiento con análogos de la timidina. Ello ha sido debido a que, aunque en las actuales guías de tratamiento antirretroviral los ITIAN siguen constituyendo la columna vertebral del TAR de inicio, los análogos de la timidina han dejado de constituir una opción preferente de tratamiento, debido a su potencial toxicidad mitocondrial y alteraciones morfológicas y al desarrollo de nuevos fármacos con mejor perfil de tolerabilidad. Al ser el objetivo principal de nuestro estudio evaluar el efecto que el tratamiento actualmente recomendado como TAR de inicio tiene en el desarrollo de toxicidad mitocondrial, resultaba obligado excluir a pacientes con análogos de la timidina.

Por otro lado el periodo de latencia entre el uso de un fármaco y el desarrollo de alteraciones morfológicas puede ser largo. Debido a ello resulta muy difícil apreciar causalidad atribuible a un fármaco concreto en pacientes que han recibido múltiples regímenes de TAR. Para evitar este problema y facilitar la imputación de casualidad o asociación a fármacos o regímenes concretos hemos incluido sólo a pacientes que han usado un único régimen de TAR desde el inicio de tratamiento.

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

Tanto para evaluar un problema que puede tener un largo período de latencia como para evaluar el potencial efecto tóxico del tratamiento sobre la actividad mitocondrial hemos requerido para la inclusión de los pacientes un tiempo mínimo de dos años de exposición al régimen de TAR. Por último, para evitar que la falta de adherencia al tratamiento pudiera hacernos subestimar el efecto del TAR sobre la función mitocondrial, hemos exigido que los pacientes incluidos tuvieran una adecuada adherencia al tratamiento. Debido a la ausencia de métodos estandarizados y sensibles para medir la adherencia al TAR, hemos elegido como marcador de adecuada adherencia la ausencia de replicación del VIH durante todo el período de seguimiento desde el inicio del TAR.

Estos criterios de selección han permitido minimizar en lo posible potenciales sesgos y suponen una novedad de nuestro estudio[45, 143]. El hecho de haber recibido un solo TAR permite evaluar el efecto de cada uno de los antirretrovirales, evitando factores de confusión. El tiempo mínimo elegido de dos años de tratamiento responde a las evidencias de ensayos clínicos que demostraron diferencias en la incidencia de lipoatrofia entre las diferentes parejas de ITIAN a las 96 semanas de seguimiento[144, 145]. Y la exigencia de supresión viral mantenida asegura la correcta adherencia al tratamiento.

Para evaluar el efecto de la infección por el VIH hemos diseñado un estudio de casos y controles en el que hemos incluido dos grupos, un grupo de estudio de pacientes con infección por el VIH *naïves* y un grupo control de pacientes sin infección por el VIH, emparejados por edad, sexo e infección por el VHC. De esta forma se ha podido evaluar el efecto del VIH con independencia de la existencia de coinfecciones ó fármacos antirretrovirales.

Por otro lado el haber incluido dentro del grupo control (pacientes sin infección por el VIH) sujetos infectados y no infectados por el VHC que nunca hubieran recibido tratamiento para la infección crónica nos ha permitido evaluar el efecto sobre la función mitocondrial de la propia infección por el VHC.

El motivo de haber excluido a pacientes que hubieran recibido tratamiento para el VHC es que la combinación de interferón pegilado más ribavirina, que constituye hoy en día la terapia de elección para el tratamiento



de la infección crónica por el VHC, puede incrementar la depleción de ADNmt [143]. La exclusión de pacientes que hubieran recibido este tratamiento nos ha permitido por tanto evaluar sin sesgos el efecto del VHC per se.

En definitiva creemos que la metodología empleada para la definición de los distintos grupos de estudio ha sido la más adecuada para responder a las preguntas de investigación planteadas.

En nuestro estudio se demuestra que la infección por el VHC produce depleción de ADNmt. La ratio ADNmt/ADNn en pacientes infectados por el VHC, no infectados por el VIH, fue inferior a la de los pacientes no infectados por VIH ni VHC ( $p=0,001$ ). En relación a ello los datos disponibles hasta la fecha eran escasos. Un estudio realizado en el Hospital Carlos III de Madrid mostraba que los pacientes mono infectados por el VHC tenían unos niveles de ADNmt (medido en monocitos de sangre periférica) menores que los pacientes sanos, y que la coinfección VIH/VHC incrementaba esta diferencia ( $p<0,001$ ) [143]. El VHC puede dañar a las mitocondrias por diversos mecanismos patogénicos[126]. Entre ellos se ha descrito que la replicación crónica del VHC provoca la producción de radicales libres de oxígeno [146], y que la acción de estos radicales junto a la proteína del core del VHC producen daño sobre la mitocondria[123]. Otro mecanismo sería la alteración en el perfil de citokinas e interleukinas que producen las infecciones virales, lo cual puede influir en la síntesis del ADNmt[147].

El tratamiento de la infección crónica con interferón pegilado y ribavirina puede llegar a erradicar la infección por el VHC. No conocemos si en este escenario el efecto tóxico sobre la mitocondria provocado por el VHC puede revertir. Esta cuestión es de gran interés y serían necesarios nuevos estudios que aclarasen si el tratamiento eficaz del VHC puede revertir a largo plazo este efecto.

En nuestro estudio la infección por el VIH produjo de manera independiente depleción de ADNmt. En efecto, la comparación de la ratio normalizada ADNmt/ADNn entre pacientes infectados por el VIH *naives* y pacientes no infectados por el VIH (excluyendo en ambos casos a los infectados por el VHC), mostró diferencias estadísticamente significativas

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

( $p=0,000$ ). Numerosos estudios han demostrado niveles disminuidos de ADNmt en diferentes tejidos de pacientes con infección por el VIH que no recibían tratamiento (*naives*) frente a pacientes sin infección por el VIH[45, 62, 82, 101]. El VIH puede dañar la mitocondria por un mecanismo directo o a través de las citocinas proinflamatorias liberadas en respuesta a su entrada en el organismo[103]. Varios productos proteicos del VIH han demostrado ser capaces de producir *in vitro* y en modelos animales daño mitocondrial y clínica derivada de ello, como la proteína transactivadora *Tat* [104], la proteína viral R (*Vpr*) [105, 106] ó la proteasa del VIH-1[107]. En esta situación cabría especular que en pacientes infectados por el VIH la introducción del TAR, especialmente de los ITIAN, no haría sino agravar un daño estructural y genético preexistente, provocado por el retrovirus [103].

En nuestro estudio no se ha comprobado el posible efecto sinérgico del VIH y el VHC respecto a la depleción de ADNmt. Aunque, como hemos comentado previamente, la infección activa por cada uno de ellos ha demostrado de manera independiente producir descenso en los niveles de ADNmt, al comparar en nuestro estudio la ratio normalizada ADNmt/ADNn entre pacientes coinfectados por el VIH y el VHC y pacientes mono infectados por el VHC no se demostraron diferencias significativas ( $p=0,399$ ). Tampoco hubo diferencias entre pacientes coinfectados y pacientes mono infectados por el VIH ( $p=0,865$ ).

El efecto sinérgico de la coinfección se ha postulado en varias ocasiones. En un estudio llevado a cabo en el Hospital Carlos III de Madrid los pacientes coinfectados tenían niveles de ADNmt (medido en sangre periférica) menores que los pacientes mono infectados por el VIH ( $p<0,001$ ) y que los mono infectados por el VHC ( $p=0,089$ )[143]. Sin embargo dicho estudio adolece de importantes limitaciones metodológicas que hacen que interpretemos con cautela los resultados. Así para analizar este objetivo se incluyeron pacientes con y sin TAR y con y sin tratamiento para el VHC. Estos criterios de selección hacen muy dificultosa la homogeneidad de las poblaciones estudiadas y pueden haber supuesto un importante sesgo en el estudio. En este sentido, en un estudio realizado por otros autores que

excluyeron a los pacientes que hubieran recibido TAR o tratamiento para el VHC, no hubo diferencias significativas en la cuantificación de ADNmt en hepatocitos entre mono infectados por el VHC y coinfectados por el VIH/VHC ( $p=0,75$ )[148].

En nuestro estudio el tratamiento antirretroviral evaluado, que es el recomendado en la actualidad y que está basado en la combinación de ITIANs no análogos de la timidina más un ITINAN ó un IP/r, no produjo un descenso significativo en la ratio ADNmt/ADNn. Efectivamente, la comparación de la ratio normalizada ADNmt/ADNn entre pacientes infectados por el VIH en TAR y pacientes *naïves* no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,973$ ). En el análisis univariante realizado sobre la población total el TAR tampoco demostró tener un efecto estadísticamente significativo sobre la variable dependiente ADNmt/ADNn ( $p=0,052$ ). La variable TAR quedó fuera del modelo final de regresión lineal múltiple.

El uso de ITIAN se ha visto directamente relacionado con el desarrollo de toxicidad mitocondrial desde que en 1990 se hablara por primera vez de la miopatía provocada por AZT[47]. Sin embargo en los últimos años han surgido nuevos fármacos que han relegado a los antiguos ITIAN a una segunda línea. Hoy en día se recomienda que el TAR de inicio basado en ITIAN se realice con alguno de los siguientes fármacos: lamivudina (3TC) ó emtricitabina (FTC) con abacavir (ABC) ó tenofovir (TNF) [12]. El perfil de seguridad de estos fármacos es mejor que el de sus antecesores. Un estudio para medir la toxicidad mitocondrial *in vitro* de tenofovir (TNF), emtricitabina (FTC) y abacavir (ABC) solos o en combinación con didanosina (ddI), estavudina (d4T), lamivudina (3TC) ó zidovudina (AZT) mostró que TNF, 3TC y FTC tenían una toxicidad mínima, casi inexistente, ddI y d4T inducían una depleción de ADNmt dependiente de tiempo y de dosis y ABC incrementaba los niveles de lactato, pero no inducía depleción de ADNmt. La combinación 3TC+TNF tenía una toxicidad mínima y FTC+TNF reducía ligeramente la proliferación celular pero no afectaba a los parámetros mitocondriales. El resto de combinaciones que incluían ddI, d4T ó AZT mostraban efectos adversos sobre el metabolismo mitocondrial[149].

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

Los datos obtenidos en nuestro estudio son concordantes con la hipótesis de que los nuevos ITIAN no análogos de la timidina no producen, al menos a corto plazo, un deterioro significativo en la función mitocondrial.

Estos resultados son muy prometedores porque sugieren que en el futuro y con el TAR recomendado el desarrollo de toxicidad mitocondrial puede llegar a ser un problema mucho menos frecuente.

Sin embargo en el análisis multivariante se identificaron 2 fármacos con efecto deplectivo sobre el cociente ADNmt/ADNn. En primer lugar en nuestro estudio el uso de ddI se relacionó con un descenso en la ratio ADNmt/ADNn, tanto en el análisis univariante ( $p=0,002$ ) como en el multivariante ( $p=0,004$ ). El hecho de que entre los ITIAN las asociaciones que contienen ddI provoquen mayor depleción de ADNmt que las basadas en TNF ó ABC, ha sido ampliamente recogido en la literatura[40, 41, 52, 71, 72, 77, 149]. El uso de ddI+3TC como pareja de ITIANs ha sido evaluado en diversos estudios [150-152], demostrando ser una asociación altamente eficaz. Debido a ello esta combinación ha sido recomendada como de uso alternativo en terapia antirretroviral de inicio[13], ya que no se dispone de un número suficiente de ensayos clínicos comparadores con la pareja de ITIAN de referencia (TDF/FTC-3TC). El descenso de la ratio ADNmt/ADNn con ddI/3TC obtenido en nuestro estudio no apoyaría la inclusión de esta pareja de fármacos como pauta electiva de TAR de inicio.

En segundo lugar llama la atención el hecho de que los regímenes basados en IP/r como tercer fármaco hayan producido una menor depleción de la ratio ADNmt/ADNn que los basados en Efavirenz. El papel que EFV puede jugar en el desarrollo de toxicidad mitocondrial está aún por evaluar. Sin embargo existen dos comunicaciones a congresos (no publicadas posteriormente) en las que se ha comunicado un mayor riesgo de lipoatrofia en pacientes que recibían EFV frente a IP. En las conclusiones del ACTG 5142, un ensayo clínico que comparaba EFV con lopinavir/ritonavir (en ambos casos con 3TC+d4T/AZT ó TNF), tras ajustar los resultados según el 2º ITIAN utilizado, se encontraba una mayor incidencia de lipoatrofia en el grupo de EFV (OR 2,7,  $p<0,001$ )[153]. Un estudio presentado por Cameron *et al.*, en el que

se randomizaban los pacientes a AZT/3TC más Lopinavir/r ó EFV mostró a las 96 semanas un 34% de lipoatrofia en el grupo de EFV, y un 5% en el grupo de Lopinavir/r. Sin embargo en este estudio los pacientes del grupo de LPV/r que mantenían a las 24 semanas carga viral indetectable eran randomizados a suspender los ITIAN ó a mantener la triple terapia. Los propios autores comentan que sus resultados pueden estar limitados por el hecho de que EFV siempre estuvo acompañado por AZT y 3TC[154].

En cualquier caso nuestro estudio aporta unos resultados acordes con los expuestos hasta ahora. Las repercusiones sobre las manifestaciones morfológicas de toxicidad mitocondrial que puede tener el uso a largo plazo de EFV como tercer fármaco en el TAR de inicio deberán ser establecidas con más estudios.

En resumen, la toxicidad mitocondrial es un fenómeno muy complejo, en el que intervienen múltiples factores, desde el TAR hasta la infección por diferentes virus. Las manifestaciones metabólicas y morfológicas que se producen, a menudo irreversibles y fatales, requieren herramientas sencillas y efectivas que ayuden a predecirlas. A pesar de sus limitaciones, la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en sangre periférica constituye, hoy en día, una herramienta útil y adaptable a la práctica clínica habitual.

*"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"*

## **VII. CONCLUSIONES**

1. El tratamiento antirretroviral recomendado en la actualidad basado en ITIAN no análogos de la timidina más un ITINAN ó IP/r no produce un descenso significativo en la ratio ADNmt/ADNn.
2. La infección por el VIH produce de forma independiente depleción de ADNmt.
3. Entre los ITIAN las asociaciones que contienen ddI provocan mayor depleción de ADNmt que las basadas en TNF ó Abacavir.
4. Los regímenes basados en ITINAN como tercer fármaco provocan mayor depleción de ADNmt que los basados en IP.
5. La infección por el VHC produce de forma independiente depleción de la ratio ADNmt/ADNn.
6. No existe efecto sinérgico respecto a la depleción de ADNmt entre el VIH y el VHC.

## **VIII. GLOSARIO**

ABC:	Abacavir
ADN:	Acido desoxirribonucleico
ADNmt:	ADN mitocondrial
ARN:	Acido ribonucleico
ARNmt:	ARN mitocondrial
ATP:	Adenosín trifosfato
AZT:	Zidovudina
CDC:	Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades
CV:	Carga Viral
d4T:	Estavudina
ddC:	Zalcitabina
ddI:	Didanosina
DHHS:	Department of Health and Human Services
EFV:	Efavirenz
FTC:	Emtricitabina
GESIDA:	Grupo Español de Estudio sobre el SIDA
IFN:	Interferón
IP:	Inhibidores de la proteasa
ITIAN:	Inhibidores de la Transcriptasa Inversa Análogos de los Nucleósidos/Nucleótidos.
ITINAN:	Inhibidores de la Transcriptasa Inversa No Análogos de los Nucleósidos/Nucleótidos.
IP/r:	IP potenciado con ritonavir
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido
ROS:	Radicales libres de oxígeno
SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
TAR:	Tratamiento Antirretroviral
TNF:	Tenofovir
UDVP:	Usuario de Drogas por Vía Parenteral
VHB:	Virus de la Hepatitis B
VHC:	Virus de la Hepatitis C
VIH:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

## **IX. ANEXO**

### **Anexo 1. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS**

**Nombre y apellidos:**

**Grupo:**

**Edad:**

**Nº identificación:**

**Sexo:** Hombre / Mujer

**HC:**

**Fecha diagnóstico VIH:**

**Fecha primera práctica de riesgo:**

**Práctica de riesgo:** UDVP / Vía sexual / Trasfusiones / Otros

**Consumo actual:**

Tabaco ( cig/d)

Heroína

Alcohol ( g/d)

Metadona ( mg/d)

Cannabis

Cocaína

**Estadío CDC:**

- **Historia tratamiento antirretroviral:**

PAUTA	Fecha de inicio

- **CD4 nadir (y fecha):**
- **Carga viral previa al inicio de la TARGA:**

- **Coinfección por:**

**VHB:** No / Sí Carga viral más reciente:

**VHC:** No / Sí Carga viral más reciente:

- **Peso:** Kg

- **Talla:** m

- **IMC:**

- **Perímetro cintura:**

- **Perímetro cadera:**

-**TA:**

CD4	CV	ADNmt/ADNn

Hb	Plaq	Leu	Glu	Urea	Creat	Na	K	Ca	Prot	Alb

Amil	AST	ALT	GGT	FA	Bi	CT	LDL	HDL	TGC	LDH	CK



## **Anexo 2. HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

El tratamiento con inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIAN) se ha asociado con daños a nivel mitocondrial principalmente por la vía de la inhibición de la polimerasa gamma mitocondrial.

El grado de toxicidad de cada ITIAN es diferente en función de la afinidad por la polimerasa gamma, y según estudios in vitro es, de mayor a menor: ddc > DDI > D4T > AZT > 3TC = tenofovir = abacavir.

Con este estudio se pretende profundizar en el conocimiento de la interacción entre los ITIAN y el DNA mitocondrial para poder llegar a conclusiones que puedan ser beneficiosas para las opciones terapéuticas futuras.

Para ello es necesario el análisis de una muestra de 5 ml de sangre mediante una sola extracción. El riesgo que supone es el mismo que el de cualquier extracción rutinaria de sangre. En raras ocasiones puede aparecer un pequeño hematoma o una infección localizada en el punto de punción.

Su participación es completamente voluntaria. Su posterior seguimiento y tratamiento de su enfermedad no se verá modificado por aceptar o no la propuesta de inclusión en el estudio. Además, en ninguno de los informes aparecerá su nombre, y sus datos personales no serán revelados salvo para cumplir con los fines descritos.

Los resultados obtenidos podrán ser comunicados a las autoridades sanitarias y, eventualmente, a la comunidad científica.

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo, .....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He recibido suficiente información y he podido hacer preguntas sobre el estudio.

He hablado con.....

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Presto libremente mi conformidad para poder participar en el estudio.

Firma:

## **X. BIBLIOGRAFÍA**

1. UNAIDS. *Informe sobre la epidemia mundial de sida, 2008*. 2008 [http://www.unaids.org/es/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2008/2008\\_Global\\_report.asp](http://www.unaids.org/es/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2008/2008_Global_report.asp).
2. UNAIDS. *UNAIDS/WHO AIDS Epidemic Update: December 2006*. 2006 [http://www.unaids.org/en/HIV\\_data/epi2006/default.asp](http://www.unaids.org/en/HIV_data/epi2006/default.asp)].
3. Pineda J, R.A., Macías J, Leal M, *Reconstitución inmune*, in *Manual del sida*, V.S.y.J. González-Lahoz., Editor. 2001, Permanyer S.A: Barcelona. p. 478-94.
4. Connick, E., et al., *Immune reconstitution in the first year of potent antiretroviral therapy and its relationship to virologic response*. J Infect Dis, 2000. **181**(1): p. 358-63.
5. Blanco JL, M.J., Pérez-Cuevas JB, Gatell JM, *Historia natural, clasificación y pronóstico de la infección por el VIH*, in *Guía práctica del SIDA. Clínica, diagnóstico y tratamiento*, C.B. Gatell JM, Podzamczar D, Miró JM, Mallotas J, Editor. 2002, Masson S.A: Barcelona. p. 47-58.
6. Pérez Cortés S, C.B.M., Esquitino del Río B, *Historia natural y clasificación de la infección por el VIH-1 en el adulto*, in *La infección por el VIH: Guía Práctica*, P.E. Pachón J, Rivero A, Editor. 2003, SAEI. p. 85-94.
7. Gatell, J., *Clasificación de la infección por el VIH. Criterios de SIDA*, in *Manual del sida*, V.S.y.J. González-Lahoz., Editor. 2001, Permanyer S.A: Barcelona. p. 140-45.
8. Pujol E, R.R., Cuesta F, Viciano P, *Principios generales del tratamiento antirretroviral*, in *La infección por el VIH: Guía Práctica*, P.E. Pachón J, Rivero A, Editor. 2003, SAEI. p. 385-402.
9. Gatell, J.M., [*HIV infection: to eradicate it or control it?*]. Med Clin (Barc), 1999. **113**(19): p. 741-2.
10. González-Lahoz J, G.J., *Terapias combinadas*, in *Manual de SIDA*, G.-L.J. Soriano V, Editor. 2002, Idepasa: Madrid. p. 570-578.
11. Knobel, H., et al., *Adherence and effectiveness of highly active antiretroviral therapy*. Arch Intern Med, 1998. **158**(17): p. 1953.
12. GESIDA. *Recomendaciones de Gesida y PNS sobre el tratamiento antirretroviral del adulto (2009; Borrador para discusión pública)*. Disponible:[http://www.gesida.seimc.org/pcientifica/fuentes/DcyRc/Gesida\\_dcyrcBR2008RecomendacionesTARGESIDA-PNS\\_ver2009-para%20discusion%20publica.pdf](http://www.gesida.seimc.org/pcientifica/fuentes/DcyRc/Gesida_dcyrcBR2008RecomendacionesTARGESIDA-PNS_ver2009-para%20discusion%20publica.pdf).
13. DHHS. *Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents*. Department of Health and Human Services. November 3, 2008; 1-138 <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>
14. Galli, M., et al., *Gender differences in antiretroviral drug-related adipose tissue alterations. Women are at higher risk than men and develop particular lipodystrophy patterns*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2003. **34**(1): p. 58-61.

15. Jacobson, D.L., et al., *Prevalence of, evolution of, and risk factors for fat atrophy and fat deposition in a cohort of HIV-infected men and women*. Clin Infect Dis, 2005. **40**(12): p. 1837-45.
16. Murri, R., et al., *Access to antiretroviral treatment, incidence of sustained therapy interruptions, and risk of clinical events according to sex: evidence from the I.Co.N.A. Study*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2003. **34**(2): p. 184-90.
17. Ofotokun, I. and C. Pomeroy, *Sex differences in adverse reactions to antiretroviral drugs*. Top HIV Med, 2003. **11**(2): p. 55-9.
18. Miller, M.A., *Gender-based differences in the toxicity of pharmaceuticals--the Food and Drug Administration's perspective*. Int J Toxicol, 2001. **20**(3): p. 149-52.
19. Casau, N.C., *Perspective on HIV infection and aging: emerging research on the horizon*. Clin Infect Dis, 2005. **41**(6): p. 855-63.
20. Mocroft, A., et al., *Reasons for modification and discontinuation of antiretrovirals: results from a single treatment centre*. Aids, 2001. **15**(2): p. 185-94.
21. Dorrucchi, M., et al., *Time to discontinuation of the first highly active antiretroviral therapy regimen: a comparison between protease inhibitor- and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-containing regimens*. Aids, 2001. **15**(13): p. 1733-6.
22. van Roon, E.N., et al., *Incidence of discontinuation of highly active antiretroviral combination therapy (HAART) and its determinants*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1999. **20**(3): p. 290-4.
23. Ferrer, E., et al., *Analysis of the discontinuation of protease inhibitor therapy in routine clinical practice*. Scand J Infect Dis, 1999. **31**(5): p. 495-9.
24. Carr, A. and D.A. Cooper, *Adverse effects of antiretroviral therapy*. Lancet, 2000. **356**(9239): p. 1423-30.
25. Max, B. and R. Sherer, *Management of the adverse effects of antiretroviral therapy and medication adherence*. Clin Infect Dis, 2000. **30** Suppl 2: p. S96-116.
26. Montessori, V., et al., *Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection*. Cmaj, 2004. **170**(2): p. 229-38.
27. Schiller, D.S., *Identification, management, and prevention of adverse effects associated with highly active antiretroviral therapy*. Am J Health Syst Pharm, 2004. **61**(23): p. 2507-22.
28. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
29. Kakuda, T.N., *Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity*. Clin Ther, 2000. **22**(6): p. 685-708.
30. Domingo, P., *Toxicidad mitocondrial, in Efectos adversos del tratamiento antirretrovirico: importancia y espectro clinico*. p. 19-44.
31. de Mendoza, C., et al., *Could mitochondrial DNA quantitation be a surrogate marker for drug mitochondrial toxicity?* AIDS Rev, 2004. **6**(3): p. 169-80.
32. DiMauro, S. and E.A. Schon, *Mitochondrial DNA mutations in human disease*. Am J Med Genet, 2001. **106**(1): p. 18-26.

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

33. Carr, A., et al., *Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance*. Lancet, 1998. **351**(9119): p. 1881-3.
34. Cossarizza, A., et al., *Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria*. Exp Cell Res, 1995. **220**(1): p. 232-40.
35. Martin, J.L., et al., *Effects of antiviral nucleoside analogs on human DNA polymerases and mitochondrial DNA synthesis*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(12): p. 2743-9.
36. Cote, H.C., *Possible ways nucleoside analogues can affect mitochondrial DNA content and gene expression during HIV therapy*. Antivir Ther, 2005. **10 Suppl 2**: p. M3-11.
37. Cossarizza, A., *Tests for mitochondrial function and DNA: potentials and pitfalls*. Curr Opin Infect Dis, 2003. **16**(1): p. 5-10.
38. Banas, B., B.P. Kost, and F.D. Goebel, *Platelets, a typical source of error in real-time PCR quantification of mitochondrial DNA content in human peripheral blood cells*. Eur J Med Res, 2004. **9**(8): p. 371-7.
39. Villarroya, F.e.a., *Toxicidad mitocondrial*, in *Efectos adversos del tratamiento antirretrovírico*, F. Lozano, Editor. 2006. p. 23-49.
40. Moyle, G.J., et al., *Hyperlactataemia and lactic acidosis during antiretroviral therapy: relevance, reproducibility and possible risk factors*. Aids, 2002. **16**(10): p. 1341-9.
41. Boubaker, K., et al., *Hyperlactatemia and antiretroviral therapy: the Swiss HIV Cohort Study*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(11): p. 1931-7.
42. Brinkman, K., *Management of hyperlactatemia: no need for routine lactate measurements*. Aids, 2001. **15**(6): p. 795-7.
43. John, M., et al., *Chronic hyperlactatemia in HIV-infected patients taking antiretroviral therapy*. Aids, 2001. **15**(6): p. 717-23.
44. Brinkman, K., et al., *Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy*. Lancet, 1999. **354**(9184): p. 1112-5.
45. Cote, H.C., et al., *Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients*. N Engl J Med, 2002. **346**(11): p. 811-20.
46. Lewis, W. and M.C. Dalakas, *Mitochondrial toxicity of antiviral drugs*. Nat Med, 1995. **1**(5): p. 417-22.
47. Dalakas, M.C., et al., *Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy*. N Engl J Med, 1990. **322**(16): p. 1098-105.
48. Arnaudo, E., et al., *Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy*. Lancet, 1991. **337**(8740): p. 508-10.
49. Herskowitz, A., et al., *Cardiomyopathy associated with antiretroviral therapy in patients with HIV infection: a report of six cases*. Ann Intern Med, 1992. **116**(4): p. 311-3.
50. Wilde, M.I. and H.D. Langtry, *Zidovudine. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy*. Drugs, 1993. **46**(3): p. 515-78.

51. Lutton, J.D., et al., *Role of heme metabolism in AZT-induced bone marrow toxicity*. Am J Hematol, 1990. **35**(1): p. 1-5.
52. Gallicchio, V.S., N.K. Hughes, and K.F. Tse, *Comparison of dideoxynucleoside drugs (DDI and zidovudine) and induction of hematopoietic toxicity using normal human bone marrow cells in vitro*. Int J Immunopharmacol, 1993. **15**(2): p. 263-8.
53. Luster, M.I., et al., *Experimental studies of the hematologic and immune system toxicity of nucleoside derivatives used against HIV infection*. Int J Immunopharmacol, 1991. **13 Suppl 1**: p. 99-107.
54. Simpson, D.M. and M. Tagliati, *Nucleoside analogue-associated peripheral neuropathy in human immunodeficiency virus infection*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1995. **9**(2): p. 153-61.
55. Moyle, G.J. and M. Sadler, *Peripheral neuropathy with nucleoside antiretrovirals: risk factors, incidence and management*. Drug Saf, 1998. **19**(6): p. 481-94.
56. Dassopoulos, T. and E.D. Ehrenpreis, *Acute pancreatitis in human immunodeficiency virus-infected patients: a review*. Am J Med, 1999. **107**(1): p. 78-84.
57. Carr, A., et al., *A syndrome of lipoatrophy, lactic acidaemia and liver dysfunction associated with HIV nucleoside analogue therapy: contribution to protease inhibitor-related lipodystrophy syndrome*. Aids, 2000. **14**(3): p. F25-32.
58. Lichtenstein, K.A., et al., *Clinical assessment of HIV-associated lipodystrophy in an ambulatory population*. Aids, 2001. **15**(11): p. 1389-98.
59. Mallal, S.A., et al., *Contribution of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors to subcutaneous fat wasting in patients with HIV infection*. Aids, 2000. **14**(10): p. 1309-16.
60. Saint-Marc, T., et al., *A syndrome of peripheral fat wasting (lipodystrophy) in patients receiving long-term nucleoside analogue therapy*. Aids, 1999. **13**(13): p. 1659-67.
61. Walker, U.A., et al., *Evidence of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor--associated genetic and structural defects of mitochondria in adipose tissue of HIV-infected patients*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2002. **29**(2): p. 117-21.
62. Shikuma, C.M., et al., *Mitochondrial DNA decrease in subcutaneous adipose tissue of HIV-infected individuals with peripheral lipoatrophy*. Aids, 2001. **15**(14): p. 1801-9.
63. Walker, U.A., B. Setzer, and N. Venhoff, *Increased long-term mitochondrial toxicity in combinations of nucleoside analogue reverse-transcriptase inhibitors*. Aids, 2002. **16**(16): p. 2165-73.
64. Cherry, C.L., et al., *Exposure to dideoxynucleosides is reflected in lowered mitochondrial DNA in subcutaneous fat*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2002. **30**(3): p. 271-7.
65. Lloreta, J., et al., *Ultrastructural features of highly active antiretroviral therapy-associated partial lipodystrophy*. Virchows Arch, 2002. **441**(6): p. 599-604.
66. Villarroya, F., P. Domingo, and M. Giralt, *Lipodystrophy associated with highly active anti-retroviral therapy for HIV infection: the*

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

- adipocyte as a target of anti-retroviral-induced mitochondrial toxicity.* Trends Pharmacol Sci, 2005. **26**(2): p. 88-93.
67. Peters, B.S., et al., *Mitochondrial myopathy associated with chronic zidovudine therapy in AIDS.* Q J Med, 1993. **86**(1): p. 5-15.
68. Lonergan JT, H.D., et al., *Hyperlactatemia in 20 patients receiving NRTI combination regimens,* in *7<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.* 2000: San Francisco.
69. Carr, A., et al., *Abacavir substitution for nucleoside analogs in patients with HIV lipodystrophy: a randomized trial.* Jama, 2002. **288**(2): p. 207-15.
70. Saint-Marc, T. and J.L. Touraine, *The effects of discontinuing stavudine therapy on clinical and metabolic abnormalities in patients suffering from lipodystrophy.* Aids, 1999. **13**(15): p. 2188-9.
71. Birkus, G., et al., *Tenofovir diphosphate is a poor substrate and a weak inhibitor of rat DNA polymerases alpha, delta, and epsilon\*.* Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(5): p. 1610-3.
72. Birkus, G., M.J. Hitchcock, and T. Cihlar, *Assessment of mitochondrial toxicity in human cells treated with tenofovir: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors.* Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(3): p. 716-23.
73. Falco, V., et al., *Severe nucleoside-associated lactic acidosis in human immunodeficiency virus-infected patients: report of 12 cases and review of the literature.* Clin Infect Dis, 2002. **34**(6): p. 838-46.
74. Fouty, B., F. Frerman, and R. Reves, *Riboflavin to treat nucleoside analogue-induced lactic acidosis.* Lancet, 1998. **352**(9124): p. 291-2.
75. Luzzati, R., et al., *Riboflavine and severe lactic acidosis.* Lancet, 1999. **353**(9156): p. 901-2.
76. Lee, H., J. Hanes, and K.A. Johnson, *Toxicity of nucleoside analogues used to treat AIDS and the selectivity of the mitochondrial DNA polymerase.* Biochemistry, 2003. **42**(50): p. 14711-9.
77. Cote, H.C., et al., *Mitochondrial:nuclear DNA ratios in peripheral blood cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients who received selected HIV antiretroviral drug regimens.* J Infect Dis, 2003. **187**(12): p. 1972-6.
78. Dalakas, M.C., C. Semino-Mora, and M. Leon-Monzon, *Mitochondrial alterations with mitochondrial DNA depletion in the nerves of AIDS patients with peripheral neuropathy induced by 2'3'-dideoxycytidine (ddC).* Lab Invest, 2001. **81**(11): p. 1537-44.
79. de Mendoza, C., et al., *Changes in mitochondrial DNA copy number in blood cells from HIV-infected patients undergoing antiretroviral therapy.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2004. **20**(3): p. 271-3.
80. van der Valk, M., et al., *Prevalence of lipodystrophy and mitochondrial DNA content of blood and subcutaneous fat in HIV-1-infected patients randomly allocated to zidovudine- or stavudine-based therapy.* Antivir Ther, 2004. **9**(3): p. 385-93.
81. Chiappini, F., et al., *Prospective evaluation of blood concentration of mitochondrial DNA as a marker of toxicity in 157 consecutively recruited untreated or HAART-treated HIV-positive patients.* Lab Invest, 2004. **84**(7): p. 908-14.

82. McComsey, G., et al., *Analysis of the mitochondrial DNA genome in the peripheral blood leukocytes of HIV-infected patients with or without lipoatrophy*. *Aids*, 2002. **16**(4): p. 513-8.
83. Hoy, J.F., et al., *Changes in mitochondrial DNA in peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected patients with lipoatrophy randomized to receive abacavir*. *J Infect Dis*, 2004. **190**(4): p. 688-92.
84. Nolan, D., et al., *Mitochondrial DNA depletion and morphologic changes in adipocytes associated with nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy*. *Aids*, 2003. **17**(9): p. 1329-38.
85. Rabing Christensen, E., et al., *Mitochondrial DNA levels in fat and blood cells from patients with lipodystrophy or peripheral neuropathy and the effect of 90 days of high-dose coenzyme Q treatment: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study*. *Clin Infect Dis*, 2004. **39**(9): p. 1371-9.
86. Miro, O., et al., *Upregulatory mechanisms compensate for mitochondrial DNA depletion in asymptomatic individuals receiving stavudine plus didanosine*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2004. **37**(5): p. 1550-5.
87. Lopez, S., et al., *Mitochondrial effects of antiretroviral therapies in asymptomatic patients*. *Antivir Ther*, 2004. **9**(1): p. 47-55.
88. Hammond, E., et al., *Reduction of mitochondrial DNA content and respiratory chain activity occurs in adipocytes within 6-12 months of commencing nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy*. *Aids*, 2004. **18**(5): p. 815-7.
89. Miro, O., et al., *Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain enzyme deficiencies are present in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients with HAART-related lipodystrophy*. *Antivir Ther*, 2003. **8**(4): p. 333-8.
90. Finsterer, J., *Mitochondriopathies*. *Eur J Neurol*, 2004. **11**(3): p. 163-86.
91. Florentz, C., et al., *Human mitochondrial tRNAs in health and disease*. *Cell Mol Life Sci*, 2003. **60**(7): p. 1356-75.
92. Mallon, P.W., Sedwell, R., et al., *Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) decrease adipocyte and monocyte mitochondrial (mt) messenger RNA transcription in the absence of changes in mtDNA or cell morphology*. *Antiviral Therapy*, 2004. **9**(L56).
93. Murakami, E., et al., *Characterization of novel reverse transcriptase and other RNA-associated catalytic activities by human DNA polymerase gamma: importance in mitochondrial DNA replication*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(38): p. 36403-9.
94. Prieto-Martin, A., J. Montoya, and F. Martinez-Azorin, *Phosphorylation of rat mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is required for transcription termination but not for binding to DNA*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(7): p. 2059-68.
95. Alexeyev, M.F., S.P. Ledoux, and G.L. Wilson, *Mitochondrial DNA and aging*. *Clin Sci (Lond)*, 2004. **107**(4): p. 355-64.
96. Martin, A.M., et al., *Accumulation of mitochondrial DNA mutations in human immunodeficiency virus-infected patients treated with*

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

- nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors. *Am J Hum Genet*, 2003. **72**(3): p. 549-60.
97. Yamaguchi, T., I. Katoh, and S. Kurata, *Azidothymidine causes functional and structural destruction of mitochondria, glutathione deficiency and HIV-1 promoter sensitization*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(11): p. 2782-8.
  98. Cazzalini, O., et al., *Early effects of AZT on mitochondrial functions in the absence of mitochondrial DNA depletion in rat myotubes*. *Biochem Pharmacol*, 2001. **62**(7): p. 893-902.
  99. Skuta, G., et al., *Molecular mechanism of the short-term cardiotoxicity caused by 2',3'-dideoxycytidine (ddC): modulation of reactive oxygen species levels and ADP-ribosylation reactions*. *Biochem Pharmacol*, 1999. **58**(12): p. 1915-25.
  100. Maisonneuve, C., et al., *Effects of zidovudine, stavudine and beta-aminoisobutyric acid on lipid homeostasis in mice: possible role in human fat wasting*. *Antivir Ther*, 2004. **9**(5): p. 801-10.
  101. Morgello, S., et al., *Mitochondrial abnormalities in human immunodeficiency virus-associated myopathy*. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1995. **90**(4): p. 366-74.
  102. Nolan, D., et al., *Contribution of nucleoside-analogue reverse transcriptase inhibitor therapy to lipoatrophy from the population to the cellular level*. *Antivir Ther*, 2003. **8**(6): p. 617-26.
  103. Moyle, G., *Mechanisms of HIV and nucleoside reverse transcriptase inhibitor injury to mitochondria*. *Antivir Ther*, 2005. **10 Suppl 2**: p. M47-52.
  104. Raidel, S.M., et al., *Targeted myocardial transgenic expression of HIV Tat causes cardiomyopathy and mitochondrial damage*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **282**(5): p. H1672-8.
  105. Jacotot, E., et al., *The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore*. *J Exp Med*, 2000. **191**(1): p. 33-46.
  106. Roumier, T., et al., *The C-terminal moiety of HIV-1 Vpr induces cell death via a caspase-independent mitochondrial pathway*. *Cell Death Differ*, 2002. **9**(11): p. 1212-9.
  107. Nie, Z., et al., *HIV-1 protease processes procaspase 8 to cause mitochondrial release of cytochrome c, caspase cleavage and nuclear fragmentation*. *Cell Death Differ*, 2002. **9**(11): p. 1172-84.
  108. Cossarizza, A., et al., *Mitochondria alterations and dramatic tendency to undergo apoptosis in peripheral blood lymphocytes during acute HIV syndrome*. *Aids*, 1997. **11**(1): p. 19-26.
  109. Cossarizza, A., et al., *Massive activation of immune cells with an intact T cell repertoire in acute human immunodeficiency virus syndrome*. *J Infect Dis*, 1995. **172**(1): p. 105-12.
  110. Franco, J.M., et al., *Reduction of immune system activation in HIV-1-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1999. **18**(10): p. 733-6.
  111. Ledru, E., et al., *Alteration of tumor necrosis factor-alpha T-cell homeostasis following potent antiretroviral therapy: contribution to*



- the development of human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy syndrome.* Blood, 2000. **95**(10): p. 3191-8.
112. Polla, B.S., et al., *Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6458-63.
  113. Li, Y.Y., et al., *Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor-alpha-induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity.* Circulation, 2001. **104**(20): p. 2492-7.
  114. Johnson, J.A., et al., *Increased systemic and adipose tissue cytokines in patients with HIV-associated lipodystrophy.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **286**(2): p. E261-71.
  115. Lagathu, C., 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**(6): p. 911-20.
  116. Mynarcik, D.C., et al., *Association of severe insulin resistance with both loss of limb fat and elevated serum tumor necrosis factor receptor levels in HIV lipodystrophy.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2000. **25**(4): p. 312-21.
  117. Christeff, N., et al., *Increased serum interferon alpha in HIV-1 associated lipodystrophy syndrome.* Eur J Clin Invest, 2002. **32**(1): p. 43-50.
  118. Carlos Martin, J., et al., *Impact of chronic hepatitis C on HIV-1 disease progression.* HIV Clin Trials, 2004. **5**(3): p. 125-31.
  119. Rust, C. and G.J. Gores, *Does hepatitis C cause liver injury by pathways associated with mitochondrial dysfunction?* Am J Gastroenterol, 1999. **94**(8): p. 2003-5.
  120. Garcia-Benayas, T., F. Blanco, and V. Soriano, *Weight loss in HIV-infected patients.* N Engl J Med, 2002. **347**(16): p. 1287-8.
  121. Zylberberg, H., et al., *Is there a relationship between hepatitis C virus infection and antiretroviral-associated lipodystrophy?* Aids, 2000. **14**(13): p. 2055.
  122. Korenaga, M., et al., *Mitochondrial dysfunction in hepatitis C.* J Clin Gastroenterol, 2005. **39**(4 Suppl 2): p. S162-6.
  123. Okuda, M., et al., *Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein.* Gastroenterology, 2002. **122**(2): p. 366-75.
  124. Hayashi, N. and E. Mita, *Fas system and apoptosis in viral hepatitis.* J Gastroenterol Hepatol, 1997. **12**(9-10): p. S223-6.
  125. Prikhod'ko, E.A., et al., *The NS3 protein of hepatitis C virus induces caspase-8-mediated apoptosis independent of its protease or helicase activities.* Virology, 2004. **329**(1): p. 53-67.
  126. Barbaro, G., et al., *Hepatocellular mitochondrial alterations in patients with chronic hepatitis C: ultrastructural and biochemical findings.* Am J Gastroenterol, 1999. **94**(8): p. 2198-205.
  127. Verucchi, G., et al., *Ultrastructural liver mitochondrial abnormalities in HIV/HCV-coinfected patients receiving antiretroviral therapy.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2004. **35**(3): p. 326-8.

"Valor de la determinación de la ratio ADNmt/ADNn en la evaluación de toxicidad mitocondrial en una cohorte de pacientes infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral estable"

128. Walker, U.A., et al., *Depletion of mitochondrial DNA in liver under antiretroviral therapy with didanosine, stavudine, or zalcitabine*. Hepatology, 2004. **39**(2): p. 311-7.
129. de Mendoza, C., et al., *Mitochondrial DNA depletion in HIV-infected patients with chronic hepatitis C and effect of pegylated interferon plus ribavirin therapy*. Aids, 2007. **21**(5): p. 583-8.
130. Carrat, F., et al., *Pegylated interferon alfa-2b vs standard interferon alfa-2b, plus ribavirin, for chronic hepatitis C in HIV-infected patients: a randomized controlled trial*. Jama, 2004. **292**(23): p. 2839-48.
131. Torriani, F.J., et al., *Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients*. N Engl J Med, 2004. **351**(5): p. 438-50.
132. Casademont, J., et al., *Enzymatic diagnosis of oxidative phosphorylation defects on muscle biopsy: better on tissue homogenate or on a mitochondria-enriched suspension?* Med Sci Monit, 2004. **10**(9): p. CS49-53.
133. Rustin, P., et al., *Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies*. Clin Chim Acta, 1994. **228**(1): p. 35-51.
134. Miro, O., 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**(5): p. 710-6.
135. Petit, C., et al., *Quantitation of blood lymphocyte mitochondrial DNA for the monitoring of antiretroviral drug-induced mitochondrial DNA depletion*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2003. **33**(4): p. 461-9.
136. Hammond, E.L., et al., *Assessment of precision and concordance of quantitative mitochondrial DNA assays: a collaborative international quality assurance study*. J Clin Virol, 2003. **27**(1): p. 97-110.
137. Brinkman, K., *Lipoatrophy and mitochondrial DNA assays: see all, know all?* Aids, 2005. **19**(1): p. 91-2.
138. Rodriguez de la Concepcion, M.L., et al., *Reverse transcriptase inhibitors alter uncoupling protein-1 and mitochondrial biogenesis in brown adipocytes*. Antivir Ther, 2005. **10**(4): p. 515-26.
139. McComsey, G. and J.F. Maa, *Host factors may be more important than choice of antiretrovirals in the development of lipoatrophy*. AIDS Read, 2003. **13**(11): p. 539-42, 559.
140. Galli, M., et al., *Incidence of adipose tissue alterations in first-line antiretroviral therapy: the LipoICoNa Study*. Arch Intern Med, 2002. **162**(22): p. 2621-8.
141. Martin, A., et al., *Reversibility of lipoatrophy in HIV-infected patients 2 years after switching from a thymidine analogue to abacavir: the MITOX Extension Study*. Aids, 2004. **18**(7): p. 1029-36.
142. Miura, T., et al., *Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy*. J Med Virol, 2003. **70**(4): p. 497-505.
143. de Mendoza, C., et al., *Mitochondrial DNA depletion in HIV-infected patients is more pronounced with chronic hepatitis C and enhanced*

- following treatment with pegylated interferon plus ribavirin. *Antivir Ther*, 2005. **10**(4): p. 557-61.
144. Gallant, J.E., et al., *Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(3): p. 251-60.
  145. Gallant, J.E., et al., *Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naive patients: a 3-year randomized trial*. *Jama*, 2004. **292**(2): p. 191-201.
  146. De Maria, N., et al., *Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C*. *Free Radic Biol Med*, 1996. **21**(3): p. 291-5.
  147. Maher, B., et al., *Lipodystrophy in patients with HIV-1 infection: effect of stopping protease inhibitors on TNF-alpha and TNF-receptor levels, and on metabolic parameters*. *Antivir Ther*, 2004. **9**(6): p. 879-87.
  148. Bauerle, J., et al., *Mitochondrial DNA depletion in liver tissue of patients infected with hepatitis C virus: contributing effect of HIV infection?* *HIV Med*, 2005. **6**(2): p. 135-9.
  149. Venhoff, N., et al., *Mitochondrial toxicity of tenofovir, emtricitabine and abacavir alone and in combination with additional nucleoside reverse transcriptase inhibitors*. *Antivir Ther*, 2007. **12**(7): p. 1075-85.
  150. Berenguer, J., et al., *Didanosine, lamivudine, and efavirenz versus zidovudine, lamivudine, and efavirenz for the initial treatment of HIV type 1 infection: final analysis (48 weeks) of a prospective, randomized, noninferiority clinical trial, GESIDA 3903*. *Clin Infect Dis*, 2008. **47**(8): p. 1083-92.
  151. Santos, J., et al., *Simplicity and efficacy of a once-daily antiretroviral regimen with didanosine, lamivudine, and efavirenz in naive patients: the VESD study*. *HIV Clin Trials*, 2005. **6**(6): p. 320-8.
  152. Santos, J., et al., *Long-term assessment of didanosine, lamivudine, and efavirenz in antiretroviral-naive patients: 3-year follow-up*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2008. **24**(1): p. 24-6.
  153. Haubrich R, R.S., and the AIDS Clinical Trials Group 5142 Study Team *Metabolic outcomes of ACTG 5142: a prospective randomised phase III trial of NRTI, PI- and NNRTI-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection, in 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2007*: Los Angeles, California
  154. Cameron DW, e.a., *Significant sparing of peripheral lipoatrophy by HIV treatment with lopinavir/r + ZDV/3TC induction followed by LPV/r monotherapy compared with EFV + ZDV/3TC, in 14<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. 2007: Los Angeles, California.