



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Toxicitat mitocondrial i hematològica en pacients pediàtrics no infectats, exposats al VIH i a antiretrovirals

Núria Rovira Girabal



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



Universitat
de Barcelona

***Toxicitat mitocondrial i
hematològica en pacients
pediàtrics no infectats, exposats
al VIH i a antiretrovirals***

Memòria presentada per
Núria ROVIRA GIRABAL
per optar al títol de Doctora en Medicina

*Treball realitzat sota la direcció del **Dr. Antoni Noguera Julian** i la **Dra. Clàudia Fortuny Guasch**, a la Unitat de Malalties Infeccioses del Servei de Pediatria de l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona (Universitat de Barcelona).*

Juny 2016

AGRAÏMENTS

- . GRÀCIES Ton i Clàudia. Gràcies, gràcies i mil gràcies.
Per ser els meus “pares” pediàtrics, per haver-me donat la mà de forma incondicional durant l’elaboració de la tesi i per ser uns autèntics mestres de sensibilitat i rigor en la feina.*
- . Gràcies Cons i la resta de companys del laboratori de metabolisme mitocondrial del Clínic.*
- . Gràcies Jorge, en aquest cas per haver insistit en què calia seguir endavant. Ets el millor exemple de tenacitat.*
- . Gràcies Carla, la meva petita gran mestra, i gràcies Saúl per donar-me l’empenta final.*
- . Gràcies família: pares, per ser-hi sempre i d’aquesta manera. Joan, Albert i Anna: gràcies pel vostre suport.*
- . Gràcies companys de feina, des de Co-R a Co-Adjunts i reste de tripulants. Seguim endavant!*
- . Gràcies a tots aquells que en algun moment m’heu preguntat per les mitocòndries.*
- . I finalment... gràcies a tots els nens del món, que fan de la dels pediatres la feina més preciosa.*

Índex

ÍNDEX	3
Índex de figures	9
Abreviacions	11
I.INTRODUCCIÓ	13
1.- El virus de la immunodeficiència humana. Generalitats.....	15
2.- Visió global de l'epidèmia per VIH i situació actual.....	17
3.- Infecció pel VIH en pediatria.....	18
3.1.- La transmissió vertical.....	18
3.2.- Diagnòstic de la infecció.....	19
3.3.- Manifestacions clíniques.....	20
3.4.- Abordatge de la infecció per VIH en pacients pediàtrics.....	20
4.- Els fàrmacs antiretrovirals	22
4.1.- Generalitats.....	22
4.2.- Tipus de fàrmacs antiretrovirals.....	22
4.2.1.- Inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs a nucleòsids.....	23
4.2.2.- Inhibidors de la transcriptasa inversa no anàlegs a nucleòsids.....	24
4.2.3.- Inhibidors de la proteasa.....	24
4.2.4.- Inhibidor de la fusió.....	25
4.2.5.- Inhibidor de l'entrada.....	25
4.2.6.- Inhibidor de la integrasa.....	25
4.3.- Tractament antiretroviral en pediatria.....	25
5.- La mitocòndria.....	26
5.1.- Generalitats.....	26
5.2.- Metabolisme i funcions de la mitocòndria.....	28
5.2.1.- La cadena respiratòria mitocondrial.....	28
5.2.2.- Apoptosi i estrés oxidatiu.....	29
5.2.3.- Genètica mitocondrial.....	29
5.3.- Estudi <i>in vitro</i> de la funció mitocondrial.....	30
5.4.- Mitocòndria i malaltia.....	32
6.- VIH, ARV i metabolisme mitocondrial.....	34
6.1.- VIH i disfunció mitocondrial.....	34
6.2.- Mecanisme de la disfunció mitocondrial secundària a ARV.....	35
6.2.1.- ITIANS.....	35
6.2.2.- ITINANS.....	36
6.2.3.- IPs.	36

6.3.- Toxicitat mitocondrial en els pacients infectats per VIH en TAR.....	36
6.4.- Opcions terapèutiques en la disfunció mitocondrial per VIH/ARV.....	38
7.- Prevenció de la transmissió vertical.....	38
7.1.- Recomanacions actuals.	38
7.1.1.- Abordatge farmacològic.	39
7.1.2.- Abordatge obstètric.	40
7.1.3.- Alletament.	40
7.2.- Efectes secundaris dels ARV en la prevenció de la transmissió vertical.....	40
7.2.1: Malformacions.	41
7.2.2. Prematuritat i baix pes al néixer.	41
7.2.3.- Risc d'infeccions i desenvolupament de la immunitat.....	42
7.3.- Toxicitat hematològica.	42
7.3.1.- Manifestacions clíniques i analítiques.	42
7.3.2.- Mecanismes fisiopatològics implicats.	43
7.4.- Toxicitat mitocondrial.	44
7.4.1.- Clínica.	44
7.4.2.- Disfunció mitocondrial en estudis de laboratori.	45
II.JUSTIFICACIÓ i HIPÒTESIS DE TREBALL	49
III.OBJECTIUS	55
IV.RESULTATS	61
- Article 1: Antiretroviral-related hematologic short-term toxicity in healthy infants. Implications of the new neonatal 4-week zidovudine regimen.....	63
-Resum article 1.	71
- Article 2: Influence of new antiretrovirals on hematological toxicity in HIV- exposed uninfected infants.....	73
-Resum article 2.....	81
- Article 3: Mitochondrial disturbances in HIV pregnancies.	83
-Resum article 3.	93

- Article 4: Decreased mitochondrial function among healthy infants exposed to antiretrovirals during gestation, delivery and the neonatal period.	97
-Resum article 4.	107
- Article 5: Mitochondrial dysfunction partially explains macrocytic anemia in HIV-exposed uninfected patients.	109
-Resum article 5.	129
V.DISCUSSIÓ	131
-Article 1	133
-Article 2	137
-Article 3	141
-Article 4	145
-Article 5	149
VI.CONCLUSIONS	153
BIBLIOGRAFIA	161
ANNEXES	185
-Annexe 1: Estadis de la infecció per VIH en pediatria.....	187
-Annexe 2: Principals efectes secundaris dels fàrmacs ARV.....	191
-Annexe 3: Components de la cadena respiratòria mitocondrial.....	193

ÍNDIX DE FIGURES

- **Figura 1** (pàg. 15): *Cicle cel·lular del VIH.*
- **Figura 2** (pàg.16): *Evolució clínica, immunològica i virològica de la infecció pel VIH.*
- **Figura 3** (pàg. 18): *Nombre de nens en tractament ARV i percentatge de nens vivint amb VIH en tractament ARV en països de baixa i mitjana renda.*
- **Figura 4** (pàg. 23): *Fàrmacs ARV i el seu mecanisme d'acció.*
- **Figura 5** (pàg. 27): *Mitochondria per microscòpia electrònica.*
- **Figura 6** (pàg. 28): *La cadena respiratòria mitocondrial.*
- **Figura 7** (pàg. 33): *Característiques clíniques de les malalties mitocondrials.*

ABREVIACIONS

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
ADNmt	Àcid desoxiribonucleic mitocondrial
ADNn	Àcid desoxiribonucleic nuclear
ARNmt	Àcid ribonucleic mitocondrial
ARV	Antiretroviral
ATV	Atazanavir
CI	Complexe I de la CRM
CII	Complexe II de la CRM
CIII	Complexe III de la CRM
CIV	Complexe IV de la CRM
CV	Complexe V de la CRM
CitC	Citocrom C
CMSP	Cèl.lules mononuclears de sang perifèrica
CoQ ₁₀	Coenzim Q ₁₀
COX II	Subunitat II del complexe IV de la CRM
COX IV	Subunitat IV del complexe IV de la CRM
CRM	Cadena respiratòria mitocondrial
CrV	Càrrega viral
CS	Citrat Sintasa
d4T	Estavudina
ddC	Zalcitabina
ddI	Didanosina
DRV	Darunavir
DTG	Dolutegravir
EFV	Efavirenz
EIM	Espai intermembrana
ENI	Exposats a VIH no infectats
ETR	Etravirina
EVG	Elvitegravir
FPV	Fosamprenavir
FTC	Emtricitabina
G3PDH	Glicerol-3-fosfat deshidrogenasa
IDV	Indinavir

IP	Inhibidor de la proteasa
ITIAN	Inhibidor de la transcriptasa inversa anàleg a nucleòsid
ITINAN	Inhibidor de la transcriptasa inversa no anàleg a nucleòsid
LPV/r	Lopinavir/ritonavir
MM	Matriu mitocondrial
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MVC	Maraviroc
NFV	Nelfinavir
NVP	Nevirapina
PTV	Prevenció de la transmissió vertical
RAL	Raltegravir
RPV	Rilpivirina
RTV	Ritonavir
SIDA	Síndrome d'immunodeficiència adquirida
SQV	Saquinavir
T20	Enfuvirtide
TAR	Tractament antiretroviral combinat
TDF	Tenofovir
TI	Transcriptasa inversa
TPV	Tipranavir
TV	Transmissió vertical
VIH	Virus immunodeficiència humana
ZDV	Zidovudina

I. Introducció

1.- El virus de la immunodeficiència humana. Generalitats.

El Virus de la Immunodeficiència Humana [VIH], és el microorganisme causal de la Síndrome d'Immunodeficiència Adquirida [SIDA]. És un virus RNA de la família retroviridae i de la subfamília de lentivirus, que fou aïllat per primera vegada l'any 1983 a l'Institut Pasteur de París (Barré-Sinoussi 1983).

Els retrovirus es caracteritzen per estar dotats d'una doble cadena d'ARN, que és transformada en ADN per la transcriptasa inversa viral [TI] (Figura 1). Aquest ADN s'integra al genoma de la cèl·lula hoste conformant el provirus, que serà transcrit a ARN i donarà lloc a proteïnes virals que estructuraran nous virions, gràcies als mecanismes de replicació i síntesi proteica de la pròpia cèl·lula infectada i a enzims codificats pel mateix virus (Gatell 2015).

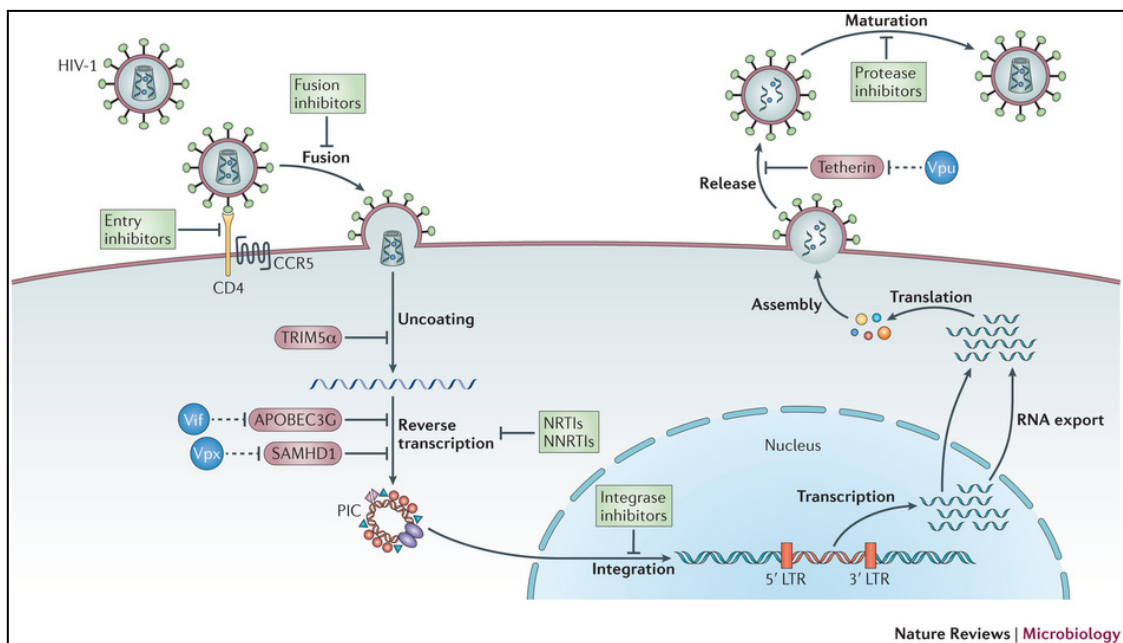


Figura 1: Cicle cel·lular del VIH (Barré-Sinoussi 2013).

El VIH es transmet per via sexual, vertical (transplacentària, intrapart o per alletament matern) i per via parenteral (transfusió de sang contaminada, ús de drogues via parenteral, etc.). Infecta preferentment a les cèl·lules amb receptors CD4, és a dir a limfòcits T col·laboradors, també a macròfags, monòcits i cèl·lules dendrítiques. L'entrada del virus a l'organisme desencadena una complexa reacció immunitària que conduirà a la destrucció de gran nombre de limfòcits i a l'establiment d'una infecció crònica en les cèl·lules amb menor índex de replicació.

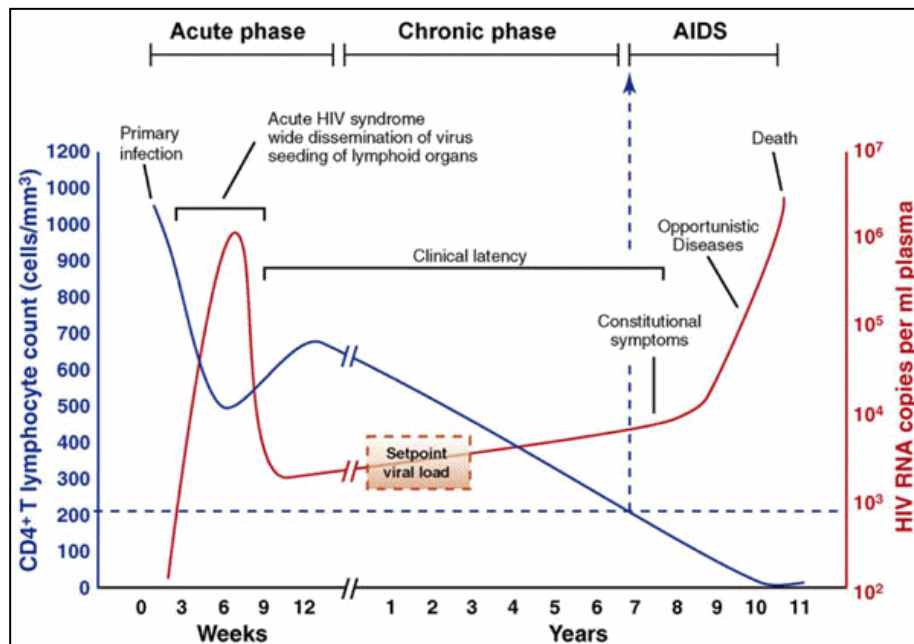


Figura 2: Evolució clínica, immunològica i virològica de la infecció pel VIH (O'Brien 2013)

En termes generals, les manifestacions clíniques de la fase inicial de la infecció en l'adult són inespecífiques i sovint és una infecció asimptomàtica. Uns 7-10 anys després, degut a la depleció de limfòcits CD4, apareixen infeccions recurrents, infeccions per microorganismes oportunistes, neoplàsies i/o manifestacions neurològiques, conformant la SIDA; d'elevada morbimortalitat en absència de tractament.

El diagnòstic de la infecció en adults és per serologia (Elisa i confirmació amb Western Blot en dues mostres diferents). La monitorització analítica de la infecció es realitza mitjançant el recompte de limfòcits CD4+ i la quantificació de la càrrega viral a plasma, mitjançant tècniques de biologia molecular.

El tractament antiretroviral combinat [TAR] consisteix en la combinació de tres o més fàrmacs antiretrovirals [ARV]. Aquest és altament eficaç en aturar la replicació i l'efecte citotòxic del virus però fins ara no ha assolit eradicar les formes quiescents i per tant curar la infecció. De fet, ha transformat el que era una infecció mortal a mig termini en una nova malaltia crònica, a canvi però de potencials efectes secundaris que s'han reduït amb els nous ARV (Cohen 2008).

En la població adulta s'inicia el TAR en el moment de la primoinfecció, diagnosticada en escasses ocasions, o més habitualment anys després de la primoinfecció, quan el pacient compleix una sèrie de criteris clínics i/o immunològics (Recomanacions espanyoles

adults 2016).

2.- Visió global de l'epidèmia del VIH i situació actual

Els primers casos de SIDA foren descrits en homes homosexuals a Estats Units d'Amèrica a principis dels anys 80. Des d'aleshores uns 39 milions de persones han mort per causes relacionades amb aquesta malaltia i a dia d'avui uns 36,9 milions de persones viuen amb la infecció pel VIH (*Onusida 2015*).

Als inicis de l'epidèmia la infecció implicava un pronòstic fatal en tots els casos i la única opció terapèutica era dirigida a tractar les infeccions oportunistes. L'any 1987 es va introduir el primer fàrmac actiu enfront al VIH, la zidovudina en monoteràpia, que tot i mostrar dades optimistes inicialment (*Fischl 1987*), va resultar insuficient degut al desenvolupament de resistències. La instauració del TAR l'any 1996 va comportar un descens de la mortalitat del 70%, amb una millora substancial de l'esperança i qualitat de vida dels afectats (*Hammer 1997*)(*Palella 1998*).

El retrat actual de l'epidèmia és irregular i divers. En els països desenvolupats, on l'accés al tractament, el correcte seguiment mèdic i les mesures preventives per a la transmissió vertical són universals la prevalença de la infecció es situa en nivells de 0,2-0,4% (*Onusida 2015*). A Espanya s'estima que unes 150.000 persones viuen infectades. L'any 2014 es van reportar 3.366 nous casos (incidència de 7-10/100.000 habitants), adquirits per contacte heterosexual (26%), per sexe entre homes (53,9%) i per ús de drogues via parenteral (3,4%) (*Ministerio de Sanidad 2015*). Les darreres dades de mortalitat corresponen a l'any 2013, quan moriren 750 persones a conseqüència de la infecció (taxa de mortalitat pel VIH 1,61/100.000 habitants), amb una edat mitjana de 49,9 anys (*Mortalidad VIH 2013*).

Pel que fa a la població pediàtrica (per sota dels 15 anys d'edat), s'estima que a nivell mundial 2,6 milions de nens estan infectats pel VIH, amb 220.000 noves infeccions l'any 2014 (*Onusida 2015*).

En els països de baixa renda l'accés al diagnòstic, al tractament i a les mesures preventives són encara clarament insuficients, malgrat la millora en els darrers anys. De fet a l'Àfrica Subsahariana es concentren el 70% de les persones infectades pel VIH i el 86,3% de les infeccions per transmissió vertical (*Onusida 2015*).

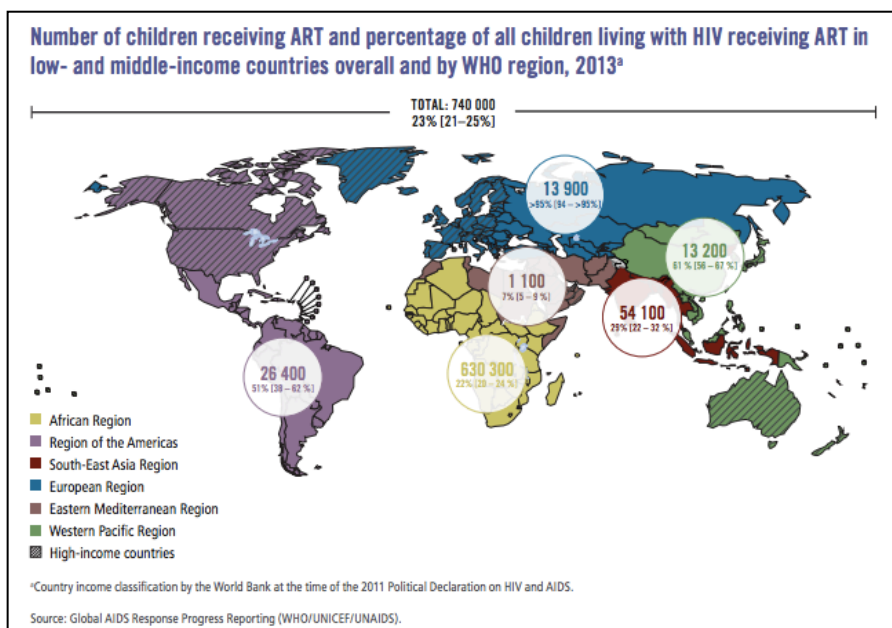


Figura 3: Nombre de nens en tractament ARV i percentatge de nens vivint amb VIH en tractament ARV en països de baixa i mitjana renda, per regions de la OMS, 2013 (Onusida 2014).

3.- Infecció pel VIH en pediatria

La infecció pel VIH a l'edat pediàtrica té característiques diferencials a nivell epidemiològic, fisiopatològic, clínic, diagnòstic i terapèutic respecte als adults. Els pacients pediàtrics infectats són més vulnerables als efectes del VIH i precisen un abordatge especialitzat i multidisciplinari (Gatell 2015)(Recomanacions espanyoles pediatria 2015).

3.1.- La transmissió vertical

En el 95% dels casos la infecció en els menors de 13 anys és adquirida per transmissió vertical [TV]. Altres vies de transmissió són la parenteral (en receptors d'hemoderivats contaminats o en adolescents addictes a drogues d'ús parenteral); i la sexual (en adolescents o en víctimes d'abusos). En les escasses situacions de transmissió no vertical, la història natural de la infecció és més similar a la descrita en adults, si bé la seva progressió és més ràpida en els pacients pediàtrics.

La taxa de TV, en absència de mesures preventives, oscil·la entre el 14 i el 43% segons les sèries, en funció del tipus d'al·letament rebut i la durada de l'al·letament matern (The European Collaborative Study 1988, 1991).

El pas de virions de la mare al fetus o nadó pot donar-se durant la gestació (infecció prenatal), en el moment del part (infecció perinatal) o durant l'al·letament matern (infecció post-natal) (Vidricaire 2004).

En absència de mesures de profilaxis i d'alletament matern, el 35% dels casos de TV són resultat del pas de virus a través de la placenta durant la gestació (infecció prenatal), especialment a les últimes setmanes de l'embaràs (*Rozioux 1995*). La infecció del fetus en les primeres setmanes de gestació determina la pèrdua fetal. La transmissió prenatal és més probable en mares immunodeprimides, en estadis avançats de la malaltia i en les que pateixen la primoinfecció durant l'embaràs (*McGowan 2000*). El major risc de TV és dona en el moment del part, degut al contacte de secrecions i sang materna amb el nadó, que pot ser infectat a través de les mucoses. En absència d'alletament matern, el 65% dels casos de TV es donen intrapart, amb percentatges encara més elevats en els nadons prematurs (*Chouquet 1997*).

En el període post part el VIH pot ser transmès per la lactància materna, suposant un 14% de risc afegit en les mares infectades prèviament o durant la gestació i del 26% en les mares que s'infecten en el post part via sexual o parenteral. El risc d'infecció del nadó augmenta amb el temps d'alletament, amb l'alletament mixt i amb la presència de mastitis i avitaminosi A. El pas de virus es dona a través de solucions de continuïtat de la mucosa oral o del tracte gastrointestinal, tant en forma de virions o a través de cèl·lules infectades (*Bulterys 1998*).

Els factors que influeixen en la transmissió mare-fill del virus són múltiples; els relacionats amb la infecció (subtipus de virus i patró de resistències, càrrega viral plasmàtica, càrrega viral en el tracte genital inferior i secrecions cèrvico-vaginals); els relacionats amb la situació materna (estadi clínic i immunològic, estat nutricional, ús de drogues, tractament antiretroviral, presència de coinfeccions); i factors obstètrics com el temps d'amniorrexi, el tipus de part, la presència d'hemorràgies, la prematuritat o la utilització de procediments invasius (amniocentesis, monitorització fetal invasiva). (*MGowan 2000*) (*Mirpuri 2010*) (*Van Dyke 2011*).

3.2.- Diagnòstic de la infecció

Per al diagnòstic de la infecció per VIH durant els primers mesos de vida dels fills de mares infectades les proves serològiques no són útils, degut al pas transplacentari d'anticossos materns (Ig G) durant la gestació. Els lactants exposats al VIH (fills de mares infectades), poden presentar una serologia positiva fins als 18 mesos, i en alguns casos inclús mes enllà, tot i que les proves de confirmació com el western-blot serien indeterminades. Per tal de conèixer precoçment la situació del nadó en relació a la infecció és imprescindible realitzar estudis que ens permetin detectar o descartar la presència del virus, sigui a través del cultiu viral, determinació d'antígens vírics o bé, com es realitza habitualment, mitjançant la detecció del genoma del virus amb tècniques d'amplificació

molecular, ja sigui genoma integrat en les cèl·lules de l'organisme (ADN-VIH-PCR) o bé el genoma de virus circulants (ARN-VIH-PCR), més utilitzat en la pràctica clínica.

Els nounats infectats durant la gestació, tindran proves virològiques positives al néixer a diferència d'aquells infectats durant el part. Per aquest motiu cal realitzar de forma periòdica controls analítics: a les 48h de vida, 3-4 setmanes, 6-8 setmanes i 12-24 setmanes de vida per tal de diagnosticar o descartar la infecció. El diagnòstic precoç és clau per tal d'iniciar el més aviat possible el TAR, que ha demostrat ser el factor pronòstic més important en els pacients pediàtrics que resulten infectats. A partir dels 18 mesos de vida el diagnòstic pot ser realitzat per serologia com en la població adulta (*Recomanacions espanyoles pediatria 2015*)(*Recomanacions americanes pediatria 2016*).

3.3.- Manifestacions clíniques

La història natural de la infecció pel VIH per TV presenta trets diferencials importants respecte a la infecció en adult, ja que la infecció incideix en un organisme en desenvolupament, diferenciació i creixement cel·lular. La resposta immunitària del nadó contra el virus és dèbil i poc capaç d'aturar la seva acció citotòxica sobre les cèl·lules immunitàries i altres teixits. La conseqüència és una infecció simptomàtica amb afectació de diferents òrgans i una alteració de la resposta immunològica, que determina una important predisposició tant per les infeccions bacterianes com per les oportunistes. En absència de tractament, la progressió a SIDA i mort és ràpida. De fet, el risc de progressió a SIDA és especialment elevat el primer any de vida (20-30%), sobretot si el nen és simptomàtic al néixer (fins al 40%), reduint-se després al 2-3% anual. La mitjana de temps de progressió a SIDA és de 4,8 anys i la supervivència mitja de 9,4 anys (*The European Collaborative Study 1994*)(*Dunn 2003*).

Les manifestacions clíniques solen aparèixer els primers mesos de vida en forma de candidiàsis muco-cutània, estancament de pes i talla, limfadenopaties, visceromegàlies i infeccions respiratòries de repetició. Posteriorment es van desencadenant successos clínics més propis de malaltia avançada, sigui per l'acció directa del virus (pneumonitis intersticial limfoide, encefalopatia per VIH, anèmia..) o secundaris a la immunodeficiència generada, com infeccions oportunistes (Pneumònia per *Pneumocystis jiroveci*, candidiàsis esofàgica) o neoplasies (limfomes) (*Tovo 1992*)(*Blanche 1994*)(*Barnhart 1996*)(*Pollack 1997*).

3.4.- Abordatge de la infecció pel VIH en pacients pediàtrics

En el moment del diagnòstic de infecció pel VIH en un pacient pediàtric cal posar especial atenció en definir la seva situació clínica, amb una exhaustiva recollida de dades

sobre els antecedents, manifestacions anteriors y actuals associades o no al VIH, coinfeccions, etc... i realitzar una exploració acurada, obtenint dades del seu estat nutricional i creixement (percentils de pes i talla, índex de massa corporal), presència d'adenopaties, hepato-esplenomegàlia i altres signes de malaltia. A més cal descartar la presència de patologia cardíaca, pulmonar, otorinolaringològica, així com avaluar la situació neurocognitiva del pacient. Per tal de conèixer la situació immunitària es determinarà percentatges i xifres absolutes de limfòcits CD4 i CD8 i d'immunoglobulines. D'altra banda caldrà obtenir informació del virus (càrrega viral, subtipus de VIH i estudi de resistències). Igualment cal informar als cuidadors sobre les característiques de la malaltia i la forma de tractar-la, per tal de garantir una millor adherència al seguiment i al tractament (*Recomanacions espanyoles pediatria 2015*)(*Recomanacions americanes pediatria 2016*).

El recompte de limfòcits CD4 és de gran utilitat en el seguiment, per la seva ben coneguda correlació amb risc de progressió de la malaltia i èxitus (*De Martino 1994*) (*Mofenson 1997*)(*Gibb 1998*) (*Gibb 2003*). Fins als 5 anys es pot utilitzar tant el nombre absolut com el percentatge de CD4 dels limfòcits totals, degut a la gran variabilitat d'aquests en els primers anys de vida. Posteriorment se'n té en compte el recompte absolut. (*Recomanacions espanyoles pediatria 2015*)(*Recomanacions americanes pediatria 2016*)(*Recomanacions europees PENTA 2015*).

La càrrega viral [CrV] constitueix una eina molt útil en la monitorització de la resposta al tractament i en pacients majors de 12 mesos sense TAR és predictor de risc de progressió de la malaltia. En pacients en TAR permet comprovar la supressió de la replicació viral així com detectar de forma precoç incompliments terapèutics o fracassos secundaris a resistències.

En el seguiment dels pacients, per tal de sistematitzar la presa de decisions, es classifica la seva situació en estadis adaptats a la població pediàtrica (**Annexe 1**) (*Centers for Disease Control and Prevention 2014*). Aquesta classificació, recentment revisada, proposa 4 categories (0, 1, 2 i 3) establertes a partir de criteris clínics i immunològics. En la categoria 0 s'inclouen aquells pacients en què dades microbiològiques discordants suggereixen una infecció molt recent. Les categories 1 i 2 es defineixen per nivells de percentatge o recomptes absoluts de CD4, mentre que la categoria 3 implica immunodeficiència greu, sigui per baixos nivells de CD4 o per presència d'infeccions

bacterianes greus recurrents, oportunistes, neoplàsies o manifestacions clíniques desencadenades pel mateix VIH, com l'encefalopatia o la síndrome d'emaciació.

La indicació de TAR és determinada per l'edat del pacient, la categoria clínico-immunològica i la CrV. En els pacients en TAR, a part de la resposta a aquest cal vetllar per la prevenció, detecció precoç i tractament dels efectes secundaris que se'n deriva, ja que actualment suposen una important càrrega de malaltia per als pacients. L'educació en hàbits de vida saludables i el suport psicosocial són també fonamentals en aquest col·lectiu de famílies (*Recomanacions espanyoles pediatria 2015*)(*Recomanacions americanes pediatria 2016*).

4.- Els fàrmacs antiretrovirals

4.1.-Generalitats

La introducció del tractament antiretroviral combinat, amb 3 o més fàrmacs ARV, ha convertit la infecció pel VIH en una malaltia crònica, tant en adults com en població pediàtrica (*Judd 2007*). No obstant, aquests fàrmacs comporten una gran càrrega d'efectes tòxics que en el cas de la població pediàtrica és especialment rellevant. A part, a mesura que va augmentant la longevitat dels pacients infectats, el temps d'exposició a fàrmacs és major. Actualment, part de la recerca pretén establir quins són els potencials riscos d'aquesta exposició i dissenyar estratègies preventives i terapèutiques per a minimitzar-los (*Weiss 2008*) (*Wainberg 2008*)(*Barré-Sanoussi 2013*).

Per tal d'homogeneïtzar dades sobre toxicitat secundària a fàrmacs ARV, la Divisió de SIDA (DAIDS) de l'Institut Nacional d'al·lèrgia i malalties infeccioses d'Estats Units, elaborà l'any 2004 unes taules per categoritzar la gravetat dels efectes secundaris relacionats als ARV, tant per adults com per pacients pediàtrics (*DAIDS 2004*). Aquesta classificació, actualitzada l'any 2014, estableix 4 graus de toxicitat: lleu, moderada, greu i de risc vital (*DAIDS 2014*).

4.2.- Tipus de fàrmacs antiretrovirals

En l'actualitat es disposa de sis famílies de fàrmacs ARV, cadascuna amb un mecanisme d'acció molecular diferent (*Gatell 2015*) (*Recomanacions espanyoles pediatria 2015*)(*Recomanacions americanes pediatria 2016*).

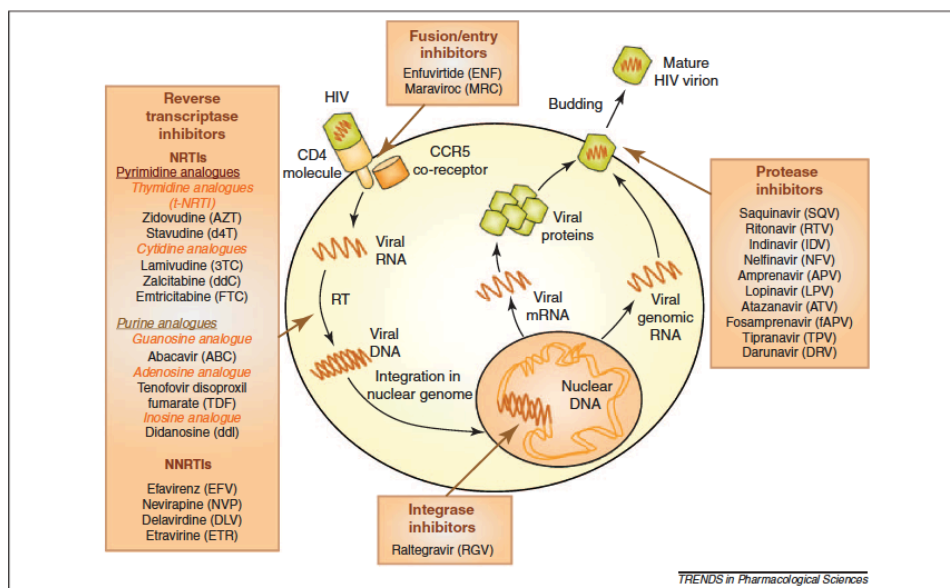


Figure 1. HIV life cycle and the sites of action of antiretroviral drugs. Available antiretroviral drugs can be divided into five groups according to the mechanism by which they interrupt the life cycle of the virus. Reverse transcriptase inhibitors inhibit the viral reverse transcriptase, either by competing with natural nucleosides (NRTIs) or by reducing its catalytic activity (NNRTIs). PIs deactivate the HIV-1 protease, preventing the generation of new virions capable of infecting other cells. Integrase inhibitors block viral DNA integration in the nuclear genome. Fusion inhibitors prevent the fusion between the virus envelope and host cell membrane, and CCR5 inhibitors block the interaction between the virus and the CCR5 receptor in the host cell membrane. Abbreviations: NRTIs, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTIs, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; PIs, protease inhibitors; RT, reverse transcriptase; CCR5, C-C chemokine receptor type 5.

Figura 4: Fàrmacs ARV i el seu mecanisme d'acció (Apostolova 2011).

4.2.1.- Inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs a nucleòsids [ITIANs]

Són molècules que per a ser actives precisen ser fosforilades dues vegades (anàleg de nucleòtid) o tres vegades (anàlegs de nucleòsids) a l'interior de la cèl·lula. Un cop activades s'incorporen a la cadena d'ADN que està essent sintetitzada per la TI a partir de l'ARN viral, bloquejant-ne l'elongació.

ITIAN	Molècula que substitueixen	Principi actiu	Nom breu	Indicació en pacients pediàtrics*
Anàleg a nucleòtid	Adenina	Tenofovir	TDF	Si (> 2 anys)*
Anàlegs a nucleòsids	Timidina	Zidovudina	ZDV	Si
		Estavudina	d4T	Si
	Iosina	Didanosina	ddI	Si
	Citosina	Lamivudina	3TC	Si
		Emtricitabina	FTC	Si (> 3 mesos)
Pirimidina	Zalcitabina	ddC	Retirat	
Guanosina	Abacavir	ABC	Si (> 3 mesos)	

TAULA 1: ITIANs. *Pot alterar la densitat òssia en pacients amb Tanner I-III.

Efectes secundaris:

El seu mecanisme de toxicitat més important és l'alteració del metabolisme mitocondrial, ja que inhibeixen també la γ -polimerasa, enzim responsable de la replicació de l'ADN mitocondrial [ADNmt]. Els seus principals efectes secundaris són l'acidosi làctica, la síndrome de lipodistròfia i l'esteatosi hepàtica. Aquests efectes són especialment

considerables en els ITIAN més antics (ZDV, d4T, ddi), essent menys freqüents en les molècules de més recent descobriment.

A part, cada fàrmac pot desencadenar altres efectes secundaris més específics (**Annexe 2.1**).

4.2.2.-Inhibidors de la transcriptasa inversa no anàlegs a nucleòsids [ITINANs]

Es fixen directament a la TI i n'inhibeixen l'activitat. No precisen ser metabolitzats per a ser actius. Fàcilment apareixen resistències.

ITINAN	Nom breu	Indicació en pacients pediàtrics
Nevirapina	NVP	Si
Efavirenz	EFV	Si (> 3 anys)
Etravirina	ETR	Si, en ≥ 6 anys
Rilpivirina	RPV	En estudi

TAULA 2: ITINANs.

Efectes secundaris:

Poden desencadenar principalment reaccions d'hipersensibilitat immunomediades o efectes per toxicitat directe del fàrmac, on també s'ha observat disfunció mitocondrial.

Els principals efectes adversos descrits d'aquesta família d'ARV són les reaccions d'hipersensibilitat cutània i l'hepatotoxicitat. La NVP és el fàrmac que més sovint desencadena aquestes reaccions. Els ITINANs més recents (etravirina i rilpavirina) no les solen presentar (**Annexe 2.2**)

4.2.3.- Inhibidors de la proteasa [IPs]

Són molècules directament actives i que entren a la cèl·lula per difusió passiva. En inhibir la proteasa impedeixen que la poliproteïna sintetitzada a partir del provirus sigui fragmentada, així doncs l'ensamblatge d'aquesta dóna lloc a virions aberrants. Són actius inclús quan l'activitat replicativa de la cèl·lula i del virus és baixa. Difícilment generen resistències, però tenen interaccions múltiples amb altres fàrmacs.

IP	Nom breu	Indicació en pacients pediàtrics
Atazanavir	ATV	Si (> 3 mesos)
Darunavir	DRV	Si (≥ 3 anys)
Fosamprenavir	FPV	Si (≥ 6 mesos)
Indinavir	IDV	No
Lopinavir/ritonavir	LPV/r	Si (> 14 dies).
Nelfinavir	NFV	Retirat l'any 2007.
Ritonavir	RTV	Si
Saquinavir	SQV	No
Tipranavir	TPV	Si (≥ 2 anys)

TAULA 3: IPs

Efectes secundaris:

Generen principalment una disfunció en el metabolisme d'hidrats de carboni i greixos, per múltiples mecanismes.

Els seus principals efectes adversos són la dislipèmia, la síndrome de redistribució de la grasa corporal, la hiperglucèmia i la resistència a insulina. Darunavir, saquinavir i atazanavir són els fàrmacs amb menys efectes adversos de la família (**Annexe 2.3**)

4.2.4.-Inhibidor de la fusió

Impedeix l'entrada del VIH a les cèl·lules. S'uneix a la gp41 de la membrana viral impedit-ne el canvi conformacional que permet la fusió de la membrana viral amb la cel·lular. El gran inconvenient d'aquest fàrmac, anomenat Enfuvirtide [T20], és que està disponible únicament per administració subcutània i per a majors de 6 anys.

Els seus efectes secundaris són escassos, encara que pot donar reaccions d'hipersensibilitat (erupció cutània, febre, vòmits, hipotensió, elevació de transaminases) i reaccions locals al punt d'inoculació.

4.2.5.- Inhibidor de l'entrada

Bloqueja la interacció entre el receptor CCR5 de la cèl·lula i la gp120 del VIH, impedit així l'entrada del virus a la cèl·lula. L'únic principi actiu que actua per aquest mecanisme, el Maraviroc [MVC], actualment s'usa només en pacients majors de 16 anys.

Dóna lloc a escassos efectes secundaris (dolor abdominal, febre, rash, hipotensió ortostàtica, mareig, tos i infeccions respiratòries de vies altes, mareig, hepatotoxicitat)

4.2.6.- Inhibidor de la integrasa

Inhibeix l'acció catalítica de la integrasa del VIH, enzim que inserta i integra el DNA viral transcrit per la TI al genoma cel·lular donant lloc al provirus. La seva inhibició impedeix la replicació viral. No té cap efecte sobre les ADN polimerases humanes. El fàrmac que més d'empra en pacients pediàtrics s'anomena Raltegravir [RAL], aprovat a partir de les 4 setmanes de vida. Elvitegravir [EVG] no té indicació en menors de 18 anys i dolutegravir [DTG] es pot administrar en pacients de 12 anys o més. Tot i que s'han descrit efectes secundaris (depressió, nàusees i diarrees, cefalea, febre, miopatia i rabdomiolisi), són fàrmacs generalment molt ben tolerats.

4.3.- Tractament antiretroviral en pediatria

Actualment totes les pautes de TAR consisteixen en la combinació de 3 o més fàrmacs ARV. L'objectiu del TAR és reduir la CrV a nivells indetectables (inferiors a 50

còpies/mL), per tal de neutralitzar l'activitat citotòxica del virus i minimitzar l'aparició de mutacions en el genoma víric que poden donar lloc a soques resistents. D'aquesta manera s'assoleix una recuperació i manteniment almenys parcial del sistema immunitari i s'inhibeix l'efecte lesiu del VIH sobre els teixits.

La indicació d'inici de TAR en els pacients pediàtrics varia en funció de l'edat. En els lactants de menys de 12 mesos d'edat està indicat en tots els casos independentment de la situació clínica, immunològica o virològica, per l'elevat risc de progressió a SIDA.

De forma simplificada, s'indica TAR en cas de complir algun dels següents criteris:

Edat	Criteris d'inici de TAR
< 12 mesos	. En tots els pacients
1-6 anys	. Infeccions oportunistes definitòries d'estadi 3*. . Immunodeficiència estadi 2 (CD4 500-999 cèls/mL) o 3 (CD4 < 500 cèls/mm ³) *. . Síntomes moderats pel VIH**. . Càrrega viral (ARN) > 100.000 còpies/mL.
≥ 6 anys	. Infeccions oportunistes definitòries d'estadi 3*. . Immunodeficiència estadi 2 (CD4 200-499 cèls/mL) o 3 (CD4 < 200 cèls/mm ³) *. . Síntomes moderats pel VIH**. . Càrrega viral (ARN) > 100.000 còpies/mL.

* veure **Annexe 1a**; ** veure **Annexe 1b**.

El règim de TAR recomanat actualment és la combinació de dos ITIANs amb o bé un IP o un ITINAN. A grans trets, els ITIANs de primera elecció són 3TC o FTC, ABC (en HLA B057-01 negatius) i ZDV. Segons l'edat i característiques clíniques s'escollirà entre un IP, preferentment LPV/r o ATV en pacients més grans; o un ITINAN (NVP en menors de 3 anys, EFV en majors) (*Recomanacions espanyoles 2015*) (*Recomanacions americanes 2016*).

5.- La mitocòndria

5.1.- Generalitats

La mitocòndria és un orgànul intracel·lular de 0.5-1 µm de diàmetre i 10 µm de longitud. Es troba en el citosol de les cèl·lules eucariotes en un nombre variable (de

centenars a milers, en funció del requeriment energètic del teixit). És responsable de la producció d'energia, la respiració cel·lular, intervé en el catabolisme i l'anabolisme de múltiples metabòlits, en l'apoptosi i l'homeòstasi del calci, entre altres (Scheffler 2010).

És fruit de l'evolució d'una bactèria aeròbia que fou fagocitada per una cèl·lula eucariota fa uns 1.500 milions d'anys (Marguli 1975). Establiren una simbiosi permanent a partir de la qual la cèl·lula eucariota proporcionava un medi estable ric en nutrients i la bactèria un metabolisme energètic aerobi d'elevat rendiment amb gran producció d'ATP. En el procés evolutiu una gran part del material genètic de la mitocòndria ha estat transferit al nucli, de forma que ja no pot ser viable fora de la cèl·lula. Igualment la mitocòndria és indispensable per al metabolisme energètic i la homeòstasi cel·lular.



Figura 5: Mitocòndria permicroscòpia electrònica
(fotografia de Don Fawcett-Keith Porter/Photo Researchers, Inc)

Està constituïda per quatre compartiments: la membrana mitocondrial externa [MME], la interna [MMI], l'espai intermembrana [EIM] i la matriu mitocondrial [MM]. (Scheffler 2010). Ambdues membranes mitocondrials són bicapes lipídiques, la MME és permeable a ions, metabòlits i polipèptids mentre que la MMI disposada en forma de les característiques crests mitocondrials és impermeable. Aquesta darrera conté proteïnes transportadores que permeten el pas d'aigua, àcid pirúvic, ADP, ATP, àcids grassos i oxigen; així com la maquinària enzimàtica de la cadena respiratòria mitocondrial [CRM] que serà descrita posteriorment. A la MM es troba, a part de múltiples metabòlits, el material genètic de la mitocòndria. És l'espai on es dona el Cicle de Krebs, la β -oxidació d'àcids grassos, l'oxidació d'aminoàcids, la síntesi d'urea i grups hemo, etc.. (Scheffler 2010).

5.2.- Metabolisme i funcions de la mitocòndria

5.2.1.-*La cadena respiratòria mitocondrial*

Consisteix en una sèrie de reaccions químiques encadenades, que tenen lloc a la MMI, a partir de la qual s'obté ATP, la moneda energètica de la cèl·lula.

A partir del catabolisme de diferents substrats (àcids grassos, aminoàcids i hidrats de carboni) s'obté acetil-CoA que entra en el Cicle de Krebs donant lloc a aigua, monòxid de carboni i poder reductor en forma de NADH i FADH₂. Aquests darrers transfereixen electrons que seran transportats per la CRM generant l'energia suficient per a la producció d'ATP mitjançant la fosforilació oxidativa. El poder reductor arriba a la MMI per diferents mecanismes, un d'ells la llançadora de glicerol-3-fosfat deshidrogenasa [G3PDH].

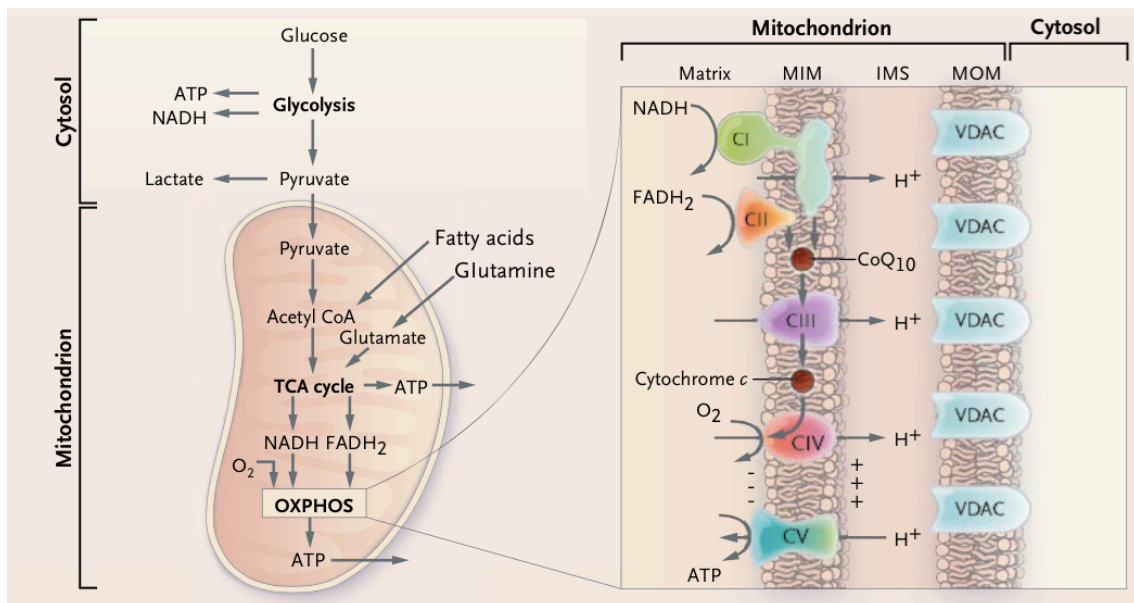


Figura 6. La cadena respiratòria mitocondrial (Koopman 2012).

TCA cycle: Cicle d'àcids tricarboxílics o Cicle de Krebs. OXPHOS: Fosforilació oxidativa. MIM: membrana mitocondrial interna. IMS: Espai intermembrana. MOM: membrana mitocondrial externa. VDAC: Canals aniónics voltatge-dependents.

La CRM està formada per cinc complexos enzimàtics [CI, CII, CIII, CIV i CV] i dos transportadors d'electrons mòbils: el Coenzim Q₁₀ [CoQ₁₀] i Citocrom C [CitC]. Entre aquests components es donen reaccions de transferència d'electrons (òxid-reducció) que generen l'energia necessària per bombejar protons contra gradient a l'EIM. Aquests protons tornaran a la MM a través del CV, desprenent gran quantitat d'energia que serà invertida en la fosforilació d'ADP a ATP (fosforilació oxidativa) obtenint així la principal moneda energètica del metabolisme cel·lular. Aquest gradient de protons confereix a la MMI el potencial de membrana mitocondrial, que és de gran importància per a l'homeòstasi mitocondrial i cel·lular.

Els complexos de la cadena respiratòria són estructures proteiques que contenen centres Fe-S i altres molècules que permeten que actuïn com a transportadors d'electrons. Estan compostos de diferents subunitats proteiques. El CII és l'únic que està codificat exclusivament en el genoma nuclear. En la resta de complexos (CI, CIII, CIV i CV) algunes subunitats són codificades en el genoma nuclear i altres en el mitocondrial (*Scheffler 2010*). (**Annexe 3**).

5.2.2.-Apoptosi i estrès oxidatiu

L'apoptosi o mort cel·lular programada és un mecanisme d'eliminació de cèl·lules no desitjades d'importància crucial per a l'homeòstasi de l'organisme. Permet eliminar cèl·lules defectuoses i amb potencial malignitat, permet el desenvolupament i la homeòstasi dels teixits i intervé en els processos d'envelliment. La mitocondria té un gran paper en la regulació d'aquest procés, ja que pot desencadenar senyals bioquímics que indueixin l'apoptosi (via intrínseca) i pot amplificar el senyal pro-apoptotíc desencadenat per receptors de la membrana cel·lular (via extrínseca).

En cas de disfunció en els processos de fosforilació oxidativa es genera espècies reactives d'oxigen, amb elevada capacitat de lesionar estructures cel·lulars. Aquest estrès oxidatiu augmenta considerablement en cas de disfunció mitocondrial i condueix a la lesió de múltiples estructures cel·lulars, entre elles el material genètic i la mateixa mitocondria (*Scheffler 2010*)(*Davis 2012*).

5.2.3.- Genètica mitocondrial

La mitocondria és l'únic orgànu cel·lular que té material genètic propi. El genoma mitocondrial consisteix en una doble cadena de ADN circular de 16.569 parells de bases, que conté 37 gens (22 ARN de transferència, 2 ARN ribosomal, i 13 codifiquen subunitats dels complexos de la CRM: 7 subunitats del CI (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 i 6), i una subunitat del CIII (citocrom b), tres subunitats del CIV (Cox I, II i III) i dues subunitats del CV (A6 i A8)). La resta de proteïnes de la CRM, així com un gran ventall d'enzims indispensables per a la replicació de l'ADNmt i per a la subsistència de la mitocondria són codificades per l'ADN nuclear [ADNn]. Aquesta **coordinació intergenòmica** és tant complexa com essencial per al bon funcionament metabòlic de la cèl·lula.

La genètica mitocondrial té tres grans trets diferencials respecte la genètica mendeliana que regeix el genoma nuclear. En primer lloc l'ADNmt prové de forma exclusiva de l'**herència materna**. Segonament, en una mateixa cèl·lula coexisteixen milers de genomes mitocondrials, per tant poden coexistir molècules d'ADNmt normal i mutant, fet que s'anomena **heteroplàsmia**. Per a que les mutacions donin la cara clínicament,

caldrà superar un llindar quantitatiu d'heteroplàsmia, que pot variar segons les necessitats energètiques de cada teixit. Finalment, en la replicació cel·lular, es dona lloc a una divisió aleatòria de les mitocondries entre les cèl·lules filles (**segregació mitòtica**), existint la possibilitat que es creui el llindar de disfunció només en algunes de les cèl·lules filles (*DiMauro 2003*)(*Scheffler 2010*).

Els haplotips o haplogrups de l'ADNmt són diferents patrons de polimorfismes que són estables i propis de cada ètnia, pel que són de gran utilitat en els estudis filogenètics de l'espècie humana, permetent definir els moviments migratoris de la raça humana des de la prehistòria. S'ha identificat nou haplogrups en les persones d'ascendència europea (H, T, U, V, W, X, J, I i K), el més freqüent d'ells és l'H (40%) (*Hart 2013*).

5.3: Estudi *in vitro* de la funció mitocondrial

En pacients amb sospita de patologia mitocondrial primària es segueixen complexos protocols diagnòstics que comprenen l'estudi de l'abast clínic d'aquesta, la identificació de metabòlits en sang, orina i eventualment en líquid cefaloraquídi, la recerca de mutacions (estudi genètic per tal de confirmar o descartar les entitats clíniques en les que està disponible) i obtenció de biòpsia muscular per a estudi histopatològic, genètic i bioquímic del teixit afecte (*Bernier 2002*)(*Eirís 2008*).

Per que fa al metabolisme mitocondrial en la detecció i la comprensió dels mecanismes de toxicitat per fàrmacs és un escenari absolutament diferent; especialment en el món de la pediatria. La realització d'estudis invasius amb finalitats únicament científiques no és èticament justificable en cap cas i per tant cal recórrer a mostres i mètodes més accessibles i més indirectes. L'elevació dels nivells sèrics de lactat poden ser un signe analític de disfunció mitocondrial, ja que aquest s'acumula quan l'organisme recorre al metabolisme anaerobi, aliè a la funció mitocondrial, per a la obtenció d'energia. Aquesta és una mesura indirecta, que pot ser falsejada per múltiples factors (extracció difícil de la mostra, ús de torniquets, temps de processament de mostres al laboratori, etc..) (*Andersen 2003*). Quan l'hiperlactatèmia s'associa a elevació dels nivells d'alanina és més suggestiva de disfunció mitocondrial (*Noguera 2004*). Tot i les seves limitacions, és una mesura que s'utilitza de rutina en el seguiment dels pacients en TAR.

En l'àmbit d'investigació s'utilitza mètodes molt més costosos, laboriosos i precisos. Idealment aquestes mostres haurien d'ésser obtingudes de teixits on la patologia mitocondrial és més manifesta, no obstant l'estudi de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica [CMSP] és una alternativa vàlida que permet mesurar una àmplia gamma de paràmetres a partir de l'extracció de 5-10 mL de sang. Les CMSP poden ser aïllades per diferents mètodes (gradient de Ficoll, dextrà atemperat), obtenint un *pellet*

que habitualment es criopreserva a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Prilutskii 1990). Tot i que aquesta tècnica ha estat qüestionada per alguns autors (Maagaard Antiv Ther 2006) (Foster 2008), i que presenta limitacions importants (Urata 2008), s'ha anat consolidant com a mètode de treball en múltiples publicacions de gran interès, especialment en el món de la pediatria (Saitoh 2007) (Morén Antiv Ther 2011).

A partir de les mostres es realitzen varis estudis que reflecteixen la funció mitocondrial a diferents nivells (Palloti 2007):

- Massa mitocondrial:

Pot ser estimada a partir de la concentració de l'enzim citrat sintasa [CS] (implicat en el cicle de Krebs) o del canal d'anions depenent de voltatge, situat a la MME. Els nivells de material genètic mitocondrial, així com les subunitats proteiques de la CRM i les activitats enzimàtiques s'expressen en valors corregits per la massa mitocondrial.

- ADNmt:

Se'n pot fer una determinació quantitativa un cop extret de la mostra, mitjançant estudis de PCR a temps real. S'amplifica una seqüència del gen ND2 (del genoma mitocondrial) i una seqüència dels gens 18SrRNA i/o RNA polimerasa IIb (genoma nuclear). Els resultats són expressats en la ratio ND2mt/18SrRNA i/o ND2mt/ARN pol IIb (Morén Antiv Ther 2011). També se'n pot fer estudis qualitius mitjançant la detecció de deleccions (Brogly 2011) i mutacions (Jitratkosol 2012), així com determinar-ne l'haplotip (Brogly 2011).

- ARN mitocondrial [ARNmt]:

L'ARN és molt més làbil i inestable que l'ADN, la seva extracció de la mostra és un procediment complex. Un cop s'obté és retrotranscrit a ADN complementari, que serà mesurat pels mateixos mètodes que l'ADNmt (Coté 2008) (Feeney 2011).

- Subunitats proteiques dels complexos de la CRM:

Per Western Blot es determina la concentració de dues de les subunitats del CIV de la CRM: la subunitat II [COX II] (codificada pel genoma mitocondrial) i la subunitat IV [COX IV] (codificada pel genoma nuclear), i s'expressa com a ràtio COXII/COXIV. Dona informació de l'activitat de traducció proteica mitocòndria depenent, més que de la capacitat funcional del CIV (McComsey 2008)(Morén 2013).

- Activitats enzimàtiques dels enzims de la CRM:

Són mesurades per espectrofotometria. És possible mesurar l'activitat de complexos individuals o combinació d'aquests. (Miró 1998)(Barrientos 2002)(Garrabou 2012).

- Consum d'oxigen:

Reflexa també l'activitat dels processos enzimàtics de la CRM. Es pot mesurar separatament en diferents complexos de la CRM o de forma global en cèl·lules intactes (Morén 2013).

- Apoptosi:

Es pot determinar mitjançant la mesura de la pèrdua del potencial de la membrana mitocondrial per citometria de fluxe, que és indicativa de fase precoç en el procés de l'apoptosi, o de la caspasa-3 activada per Western blot (McComsey 2008), més suggestiva de fases més avançades.

5.4.- Mitochondria i malaltia

Les alteracions primàries del metabolisme mitocondrial constitueixen un grup de malalties heterogènies i de diagnòstic complex (Bernier 2002). Són típicament multisistèmiques, amb major repercussió en els teixits amb major requeriment energètic (sistema nerviós central i perifèric, ulls, oïda, musculatura estriada i cor)(Scaglia 2004).

El seu patró de transmissió és particular, ja que poden ser secundàries a delecions o deplecions de l'ADNn o de l'ADNmt; i per tant podran seguir un patró autosòmic dominant o recessiu en el primer cas, o un patró de transmissió materna en el segon (Copeland 2012). En l'actualitat s'ha identificat uns 240 gens implicats en aquestes malalties, 13 dels quals pertanyents a l'ADNmt (Koopman 2012).

El pronòstic d'aquestes malalties és variable però la norma general és la degeneració neurològica progressiva (Scaglia 2004). Al moment actual no es disposa de tractament curatiu, únicament de molècules antioxidants i suplementos vitamínics que poden millorar discretament la simptomatologia.

Table 1. Clinical and Genetic Heterogeneity of Disorders Related to Mutations in Mitochondrial DNA (mtDNA).*

Symptoms, Signs, and Findings	Giant Deletions in mtDNA			Mutation in Transfer RNA		Mutation in Ribosomal RNA	Mutation in Messenger RNA		
	KSS	PEO	PS	MERRF	MELAS	AID	NARP	MILS	LHON
Central nervous system									
Seizures	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Ataxia	+	-	-	+	+	-	+	±	-
Myoclonus	-	-	-	+	±	-	-	-	-
Psychomotor retardation	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Psychomotor regression	+	-	-	±	+	-	-	-	-
Hemiparesis and hemianopia	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Cortical blindness	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Migraine-like headaches	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Dystonia	-	-	-	-	+	-	-	+	±
Peripheral nervous system									
Peripheral neuropathy	±	-	-	±	±	-	+	-	-
Muscle									
Weakness and exercise intolerance	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Ophthalmoplegia	+	+	±	-	-	-	-	-	-
Ptosis	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Eye									
Pigmentary retinopathy	+	-	-	-	-	-	+	±	-
Optic atrophy	-	-	-	-	-	-	±	±	+
Blood									
Sideroblastic anemia	±	-	+	-	-	-	-	-	-
Endocrine system									
Diabetes mellitus	±	-	-	-	±	-	-	-	-
Short stature	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Hypoparathyroidism	±	-	-	-	-	-	-	-	-
Heart									
Conduction disorder	+	-	-	-	±	-	-	-	±
Cardiomyopathy	±	-	-	-	±	+	-	±	-
Gastrointestinal system									
Exocrine pancreatic dysfunction	±	-	+	-	-	-	-	-	-
Intestinal pseudo-obstruction	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ear, nose, and throat									
Sensorineural hearing loss	±	-	-	+	+	+	±	-	-
Kidney									
Fanconi's syndrome	±	-	±	-	±	-	-	-	-
Laboratory findings									
Lactic acidosis	+	±	+	+	+	-	-	±	-
Ragged-red fibers on muscle biopsy	+	+	±	+	+	-	-	-	-
Mode of inheritance									
Maternal	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Sporadic	+	+	+	-	-	-	-	-	-

* Characteristic constellations of symptoms and signs are boxed. Plus signs indicate the presence of a symptom, sign, or finding; minus signs the absence of a symptom, sign, or finding; and plus-minus signs the possible presence of a symptom, sign, or finding. KSS denotes the Kearns-Sayre syndrome; PEO progressive external ophthalmoplegia; PS Pearson's syndrome; MERRF myoclonic epilepsy with ragged-red fibers; MELAS mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes; AID aminoglycoside-induced deafness; NARP neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa; MILS maternally inherited Leigh's syndrome; and LHON Leber's hereditary optic neuropathy.

Figura 7. Característiques clíniques de les malalties mitocondrials (Di Mauro 2003).

A part de en les malalties mitocondrials primàries, s'ha detectat disfunció mitocondrial en múltiples patologies: neoplàsies (de còlon i pròstata), glaucoma, diabetis mellitus tipus II, cardiomiopaties, arítmies, sèpsies i altres processos inflamatoris, atàxia de Friedrich, Parkinson, Alzheimer i corea de Huntington entre d'altres; així com en relació al consum de drogues d'abús. Futures investigacions profunditzaran en el grau d'implicació d'aquest orgànul en la fisiopatologia i tant de bo en les possibilitats

preventives o terapèutiques d'aquestes malalties (*Schapira 2012*)(*Nunnari 2012*). D'altra banda, el deteriorament de la funció mitocondrial sembla tenir un paper en la fisiologia de l'envelliment del cos humà (*Davis 2012*).

6.- VIH, ARV i metabolisme mitocondrial

6.1.-VIH i disfunció mitocondrial

El mateix VIH es beneficia de varis mecanismes moleculars propis que li permeten generar disfunció mitocondrial tant en les cèl·lules infectades com en altres cèl·lules contigües. Gràcies a aquests mecanismes el virus augmenta la susceptibilitat a l'apoptosi o la desencadena completament mitjançant sobretot la permeabilització de la MMI. Les proteïnes virals implicades són vàries, així com les citocines inflamatòries generades per la infecció. Els mecanismes implicats inclouen la despolarització de la MMI, la inhibició de proteïnes antiapoptòtiques i l'activació de les proapoptòtiques, augment de substàncies oxidants i reducció de les antioxidants i generació de citocines inflamatòries que desencadenen una reacció sistèmica (*Ferri 2000*).

En adults, s'ha observat depleció de l'ADNmt en CMSP de pacients infectats naifs asimptomàtics (*Côté 2002*) (*Casula 2005*) (*Maagaard, HIV Med 2006*), atribuïda a la permanent activació immunitària, que tendeix a recuperar-se quan s'inicia el TAR (*Miura 2003*) (*Haugaard 2005*)(*Maagaard 2008*). En el moment de la primoinfecció sembla ser que hi ha una elevació transitòria de l'ADNmt en sang perifèrica (*Cossarizza 2011*) procedent de la destrucció cel·lular en el procés inflamatori i infeccions. A nivell funcional, s'ha identificat una reducció de l'activitat de la CRM en CMSP (*Miró Clin Infect Dis 2004*) i una disminució del potencial de la membrana mitocondrial (*Sternfel 2007*) així com un augment de l'estrès oxidatiu (*Whanchu 2009*).

Hi ha dades que suggereixen que en absència de tractament els limfòcits CD8+ i els limfòcits B presenten una major depleció d'ADNmt (de forma proporcional a descens de CD4+ en la primoinfecció) i un cop iniciat el tractament es troba afectació únicament dels limfòcits T (*Maagaard 2008*).

Es disposa de pocs estudis de funció mitocondrial en pacients pediàtrics fora de tractament. Si bé s'ha observat menor ADNmt en comparació a controls sans, a diferència dels adults, no s'ha detectat una major depleció d'ADNmt en pacients naifs en comparació a pacients en TAR (*Morén JAIDS 2012*). La síntesi de subunitats enzimàtiques del CIV (COXII/IV) de la CRM així com algunes activitats enzimàtiques de la CRM (CIV, G3PDH-III) semblen ser menors que en la població general (*Morén JAIDS 2012*), no obstant la funció enzimàtica global de la CRM (CI-III-V) estaria preservada. S'ha observat un descens en el

consum d'oxigen que reflectiria una disminució del procés global de la respiració cel·lular, en pacients en TAR en comparació a controls sans. Aquesta disfunció mitocondrial en pacients fora de tractament semblaria ser més secundària a un increment de l'activació de l'apoptosi que a disfunció enzimàtica de la CRM (Morén 2013).

6.2.- Mecanisme de la disfunció mitocondrial secundària a ARV

Els efectes secundaris del TAR com ja hem comentat són nombrosos, alguns d'ells potencialment greus. En la seva fisiopatologia, la disfunció mitocondrial hi té un paper important, especialment en la família dels ITIANs. La repercussió clínica d'aquesta serà més important en els teixits amb major requeriment energètic, menor recanvi cel·lular i major dependència del metabolisme aerobi. Els mecanismes moleculars són diferents en cada família de fàrmacs ARV. Els ITIANs, especialment els de primera generació, són els més mitotòxics. En els fàrmacs de darrera generació sembla ser que aquest tipus de toxicitat és pràcticament inexistent.

No se sap perquè els diferents haplotips (patrons de polimorfisme) en l'ADN mitocondrial tenen associació amb paràmetres de progressió de la infecció pel VIH, resposta a tractament (recuperació de CD4+), complicacions metabòliques i a efectes secundaris dels ARV (polineuropatia perifèrica, per exemple) (Hart 2013).

6.2.1.- ITIANs

Des del poc temps d'iniciar la monoteràpia amb zidovudina ja es va observar signes de disfunció mitocondrial en els pacients amb miopatia (Dalakas 1990)(Arnaudo 1991); i en els anys successius la neuropatia perifèrica, la resistència a insulina, la hiperlactatèmia, la pancreatitis, l'esteatosi hepàtica i la síndrome de lipodistròfia foren relacionats també amb la toxicitat mitocondrial secundària a ITIANs (Brinkman 1998).

Pel mateix mecanisme que inhibeixen la transcriptasa inversa inhibeixen la γ -polimerasa, responsable de la replicació de l'ADNmt. La inducció d'errors en la transcripció i la reducció de l'activitat exonucleasa (reparadora) de l'enzim són mecanismes també implicats en aquesta toxicitat (Lewis 1995)(Martin 2003)(Kohler 2007). A part s'ha vist que l'exposició a ITIANs desencadena mutacions en el gen de la γ -polimerasa (cromosoma 15), donant lloc a major o menor activitat d'aquesta (Chattopadhyay 2014). A partir d'un determinat llindar de depleció d'ADNmt i apareixeran signes bioquímics i/o clínics de disfunció mitocondrial. L'afinitat de cada ITIAN per la γ -polimerasa és diferent. L'ordre de major a menor afinitat per la polimerasa (per tant de major a menor toxicitat) és ddC > ddi > d4T >> ZDV > 3TC/FTC > ABC = TDF (Kakuda 2000)(Lim 2001).

En els darrers anys s'ha proposat altres mecanismes de toxicitat mitocondrial dels ITIANs més enllà de la inhibició de la γ -polimerasa. Aquests són la interferència en el pool cel·lular de nucleòsids i nucleòtids, la inhibició directe dels complexos de la CRM i de la transcripció d'ADNmt a ARNm, la generació de radicals lliures d'oxigen, l'augment de l'estrès oxidatiu i la inducció de l'apoptosi (Apostolova 2011)(Pérez-Matute 2013).

6.2.2.- ITINANs

No actuen sobre el material genètic mitocondrial, sinó que desencadenen l'apoptosi cel·lular mitjançant la despolarització de la MMI (Karamchand Leshern 2008)(Apostolova 2011) per mecanismes fàrmac dependent.

6.2.3.- IPs

Els seus principals efectes secundaris són trastorns en el metabolisme lipídic i dels hidrats de carboni. La disfunció mitocondrial en el teixit adipós central genera una disminució de la lipòlisi i a l'acumulació de lípids, mentre que en el teixit adipós perifèric hi ha una atrofia d'aquest per inducció de l'apoptosi d'adipòcits (Dowell 2000).

En la resta de famílies d'ARV no s'ha demostrat toxicitat mitocondrial fins el moment actual.

6.3: Toxicitat mitocondrial en els pacients infectats pel VIH en TAR

És difícil determinar fins a quin punt la disfunció mitocondrial en aquests pacients és secundària a l'acció del virus o a la toxicitat farmacològica. Es considera que les troballes detectades en absència de tractament o a l'inici d'aquest serien mediades pel virus i les detectades en pacients que reben TAR i que tenen un control complet de la replicació viral, secundàries als fàrmacs. Cal considerar però, que probablement en aquells pacients amb infecció crònica i disfunció mitocondrial es mantenen les alteracions un cop iniciat el TAR, associant la toxicitat del mateix tractament a la que va determinar prèviament el VIH (Maagaard J Antimicrob Chemother 2009).

Múltiples dels efectes secundaris dels ITIANs tenen la disfunció mitocondrial com a base bioquímica. El més freqüent, tot i que habitualment sense clínica associada, és l'hiperlactatèmia lleu (John 2001). Excepcionalment pot desencadenar clínica, de gravetat variable, essent l'acidosi làctica la situació més temuda pel risc vital que suposa (Brinkman 2000). La miopatia, la polineuropatia perifèrica, l'esteatosi hepàtica, la pancreatitis i les

síndromes de lipodistròfia associen disfunció mitocondrial (*Brinkman 1998*)(*Coté 2002*)(*Apostolova 2011*) i possiblement també la nefropatia (*Jafari 2014*).

A partir de biòpsies tissulars s'ha objectivat signes de disfunció mitocondrial en els teixits afectes, com el múscul (*Casademont 1996*) o el teixit adipós (*Nolan 2003*). Escassos estudis avaluen la repercussió en el metabolisme mitocondrial mesurat en CMSP, amb resultats discordants. Si bé alguns estudis no han detectat diferències (*Maagaard HIV Med 2006*), s'ha reportat depleció d'ADNmt i disminució de l'activitat enzimàtica de la CRM en CMSP de pacients amb lipodistròfia (*Miró 2003*) i s'ha proposat mecanismes de compensació que permeten una funció mitocondrial normal tot i la disminució d'ADNmt en pacients asimptomàtics (*Miró 2004 JAIDS*). En aquells pacients amb hiperlactacidèmia, polineuropatia perifèrica, miopatia i lipodistròfia, la depleció d'ADNmt sembla ser major (*McComsey 2005*) (*Kampira 2014*). Aquesta depleció d'ADNmt sembla ser reversible en substituir els ITIANs més mitotòxics (*McComsey 2005*) o en interrompre el TAR (*Mussini 2005*).

Els estudis en la població pediàtrica coincideixen en l'elevada prevalença d'hiperlactatèmia asimptomàtica entre els pacients infectats en TAR, d'entorn el 30% (*Noguera 2003*)(*Desai 2003*) que es resol en interrompre l'exposició a ARV (*Noguera 2010*). Els casos d'acidosi làctica greu són afortunadament molt escassos i associats a règims amb ddi+d4T, actualment en desús (*Recomanacions espanyoles pediatria 2015*).

Si bé els pacients en TAR asimptomàtics presenten menor xifra d'ADNmt en CMSP que els controls sans, no s'ha reportat diferències en relació a pacients infectats pel VIH fora de tractament (*Morén JAIDS 2012*), fet consistent amb la mitotoxicitat pròpia de la infecció. En pacients asimptomàtics en tractament, la depleció d'ADNmt és insuficient per a repercutir en la funció de complexos individuals, ja que no associa menor ARNmt, subunitats proteiques ni activitat del complexos IV, II, II-III, G3PDH, G3PDH-CIII (*Morén Antiv Ther 2011*)(*Morén 2013*), encara que si que s'ha descrit menor activitat global de la CRM (CI-CIII-IV) (*Morén 2013*). Aquesta afectació més de la funció global de la CRM que dels complexos concrets pot ser explicada per l'efecte additiu de disfuncions menors de cadascun dels complexos, no detectables en mesurar-los per separat. Els pacients afectes de la síndrome de lipodistròfia presenten una major depleció d'ADNmt i una major repercussió funcional en la CRM en comparació amb pacients en TAR asimptomàtics, que ja si que repercuteix de forma molt més marcada en la funció global de la CRM (activitat enzimàtica CI-CII-CIV), tampoc sense detectar-se disfunció de cap complexe concret (*Morén PIDJ 2011*). L'exposició a ITIANs de 1a generació (ZDV, ddi, d4T) s'associa amb el temps a major disfunció mitocondrial, concretament a majors nivells de lactat, menor activitat del CIV (*Morén JAIDS 2012*) i a

menor ADNmt (Saitoh 2007). La interrupció programada del TAR condueix a una recuperació de l'ADNmt als 12 mesos (Noguera 2010).

6.4: Opcions terapèutiques en la disfunció mitocondrial per VIH/ARV

Per tal de contrarestar la disfunció mitocondrial desencadenada tant pel VIH com pels fàrmacs ARV, s'ha considerat la possibilitat terapèutica d'agents antioxidants (vitamines C i E, n-acetil cisteïna, extractes de Gingko biloba, etc) i del CoQ₁₀, cotransportador d'electrons de la CRM. En absència de TAR, l'administració d'antioxidants sembla reduir la càrrega viral i la progressió de la infecció ja que redueix l'estrès oxidatiu generat pel virus, reduint-ne l'acció citotòxica, i estimula el sistema immunitari (Allard 1998)(Singh 2015). En pacients ja en TAR, estudis realitzats in vitro observen que la suplementació amb CoQ₁₀ de cultius de cèl·lules endotelials tractades amb ITIANs en redueix els signes bioquímics de disfunció mitocondrial (Xue 2013). In vivo s'ha observat millora de l'hiperlactatèmia crònica asimptomàtica en adults infectats en TAR amb l'administració d'antioxidants (Lopez 2003). El tractament amb carnitina, component de l'EIM mitocondrial essencial per a la oxidació dels àcids grassos, sembla millorar la clínica de la polineuropatia per ITIANs (Hart 2004) (Youle 2007).

7.- Prevenició de la transmissió vertical [PTV]

7.1.- Recomanacions actuals

L'any 1994 es va observar una reducció del risc de TV del 25 al 8 % en administrar zidovudina oral a les gestants a partir de les 14 setmanes de gestació, zidovudina endovenosa durant el treball de part i zidovudina oral al nadó durant les primeres sis setmanes de vida (Connor 1994). Des d'aleshores s'ha anat ampliant les mesures profilàctiques en base a l'evidència científica fins al moment actual, en què s'ha reduït la taxa de TV inicial de fins al 40% a taxes actuals inferiors a l'1-2% en els països desenvolupats (Cooper 2002)(European Collaborative Study 2005)(Towsend 2008)(Towsend 2014).

En el nostre medi, el bon control de la malaltia assolit des de la instauració del TAR, amb absència de clínica i amb bona qualitat de vida en gran part dels casos, ha permès que moltes dones infectades es plantegin la maternitat com a opció possible i segura malgrat la infecció. En països en vies de desenvolupament, l'elevada natalitat, la major prevalença de la infecció, les majors dificultats per a la identificació, control i tractament de les gestants infectades i l'al·letament matern perllongat determinen que les taxes de transmissió

vertical siguin encara elevades, tot i que ha reduït de forma considerable el nombre de nous casos. Les guies de PTV estan en constant revisió per tal d'oferir la màxima seguretat amb la mínima iatrogènia. En aquesta evolució s'ha deixat enrere la monoteràpia amb zidovudina en les gestants, s'ha introduït la pràctica del part vaginal en casos de bon control, s'ha escurçat el temps de profilaxi neonatal i en els països en vies de desenvolupament s'ha proposat l'alletament matern sota profilaxi farmacològica.

La PTV comença amb el cribat universal de la infecció pel VIH a totes les gestants, molt estès en els països desenvolupats però encara insuficient en els països de baixa renda. Es recomana realització de serologia a l'inici del control gestacional (primer trimestre) i en casos de risc d'infecció (promiscuïtat, addicció a drogues via parenteral, presència d'altres malalties de transmissió sexual, etc...) repetir-la abans de la setmana 36 d'embaràs (*Recomanacions espanyoles PTV 2013*).

Les gestants infectades i els seus nadons rebran una sèrie de mesures profilàctiques que consisteixen en l'ús de fàrmacs ARV, l'adequació de les actuacions obstètriques i la contraindicació de l'alletament matern quan és possible.

7.1.1.- Abordatge farmacològic:

En el moment actual s'indica TAR en tota gestant infectada pel VIH, independentment de la seva situació clínica i/o immunològica, amb l'objectiu de reduir la CrV a nivells indetectables i així reduir-ne la transmissibilitat.

En aquelles pacients que ja es trobaven en tractament en el moment de la concepció, s'adequa la pauta per a que sigui segura i ben tolerada durant l'embaràs. En les gestants que prèviament a l'embaràs no havien requerit ARV, s'inicia TAR a partir de les 14 setmanes de gestació per evitar teratogènia durant l'embriogènesi. L'evidència actual mostra que la TV del VIH disminueix amb l'inici precoç del TAR (*Towsend 2014*).

La administració de ZDV endovenosa en el moment del part, ha estat una realitat en el nostre medi fins l'actualitat (*Recomanacions espanyoles PTV 2013*), si bé la seva indicació podria limitar-se a aquells casos en els que la CrV es detectable, en especial si es superior a 1000 còpies d'ARN-VIH/ml (*Recomanacions americanes PTV 2015*).

Els nadons reben també profilaxi farmacològica amb una pauta ARV més o menys intensa segons el risc de la gestació. Quan el control virològic en la mare ha estat correcte s'indica zidovudina oral durant 4 setmanes, si bé algunes guies ja recomanen profilaxis de només 10 dies de durada en els pacients de menor risc (*Recomanacions americanes PTV 2015*). En aquells casos en què no s'ha aconseguit suprimir la CrV en la mare s'administra

profilaxi amb tres fàrmacs ARV, habitualment ZDV, 3TC i NVP, que es suspenen a les 4 setmanes de vida si els estudis de detecció de genoma viral en el nadó resulten negatius.

7.1.2.- Abordatge obstètric:

Des del punt de vista obstètric, es realitza cesària electiva en casos de control insuficient de la infecció o previsió de dificultats obstètriques durant el treball de part. El part vaginal es contempla sempre en gestants amb bon control de la malaltia, CrV indetectable i bona adherència al TAR; sempre evitant l'amniorrexi artificial, la instrumentació del part i en la mesura del possible l'episiotomia. Les tècniques de monitorització fetal invasiva i la realització de pH de calota estan totalment contraindicades. En cas d'amniorrexi perllongada, part prematur, sospita de pèrdua de benestar fetal o previsió de treball de part perllongat, s'indicarà cesària en curs de part.

En el nadó cal es recomana evitar puncions (injecció de vitamina K, canalització de vies, controls de glicèmia) fins que la pell estigui totalment neta de secrecions vaginals i de sang materna (*Recomanacions espanyoles PTV 2013*)(*Recomanacions americanes PTV 2015*).

7.1.3.- Alletament:

En els països desenvolupats l'alletament matern està contraindicat pel risc afegit de transmissió post-natal. Aplicar aquesta mesura en països en desenvolupats, on la salubritat i la higiene són insuficients, comporta riscos sanitaris considerables (*Creek 2010*)(*Kafulafula 2010*); pel que la Organització Mundial de la Salut recomana l'alletament artificial únicament en els casos en què es compleixi les condicions higièniques mínimes per a que sigui un procediment segur (*Guidelines on HIV and infant feeding 2010*). En cas que s'instauri alletament matern és útil allargar la durada de la profilaxi en la mare i/o nadó amb ARV fins que aquest es retiri (*Shapiro 2010*) (*The Kesho Bora Study Group 2011*).

7.2.- Efectes secundaris dels ARV en la prevenció de la transmissió vertical

Des de la instauració de les mesures de PTV han aparegut en escena el col·lectiu de nadons fills de mares infectades pel VIH i que per tant han estat exposats al VIH i a ARV durant el seu desenvolupament fetal, i que no han contret la infecció. Ens referirem a aquests pacients com a exposats no infectats [ENI].

Si bé el benefici de les mesures farmacològiques en la PTV ha estat obvi i gens qüestionat des de la seva instauració, la càrrega d'efectes adversos que comporten, així

com la seva potencial repercussió a llarg termini són motiu de preocupació entre la comunitat científica (*Cianarello 2008*)(*Martin 2009*)(*Heidari 2011*)(*Sollai 2015*). És per això que les guies recomanen un seguiment exhaustiu i perllongat dels ENI, per tal de reconèixer i abordar les conseqüències avui encara incertes de l'exposició al VIH i als fàrmacs ARV en un període tant crític per al desenvolupament com el fetal i neonatal.

No s'ha observat afectació en el neurodesenvolupament de pacients exposats a ARV en comparació als no exposats a ARV (*Alimenti 2006*)(*Williams 2010*), ni tampoc en el creixement antropomètric (*Culnane 1999*)(*European Collaborative Study 2005*).

Malgrat és ben coneguda la toxicitat sobre el material genètic pel pas transplacentari de ZDV (*Wogan 2007*), no es disposa de dades que determinin a llarg termini del risc de carcinogènesi que comporta l'exposició (*Sollai 2015*). No s'ha comunicat un augment de casos de càncer en cap de les grans cohorts d'ENI (*Brogly 2006*)(*Hankin 2007*)(*Benhammou 2008*). S'ha observat un augment d'aneuploidia i canvis en la transcripció genètica en precursors hematopoètics de sang de cordó de nadons ENI, canvis que afavoririen la carcinogènesi en aquest col·lectiu (*André-Schmutz 2013*).

A part de la toxicitat hematològica i de la repercussió en la funció mitocondrial, que desenvoluparem més endavant, els efectes secundaris dels ARV en els pacients ENI són els següents:

7.2.1.- Malformacions

Si bé no s'observa major incidència de malformacions en els ENI en comparació a la població general (*Watts 2011*)(*Knapps 2012*), la major part de les guies de PTV recomanen evitar efavirenz en dones gestants, en associar-se el seu ús en el primer trimestre d'embaràs amb defectes del tub neural en el fetus (*Saitoh 2005*)(*Brogly 2010*) (*Knapps 2012*). Aquesta teratogenicitat es veu qüestionada per revisions sistemàtiques (*Ford 2014*) que proposen reintroduir efavirenz en les guies com a fàrmac segur durant l'embaràs.

7.2.2.- Prematuritat i baix pes al néixer

La infecció pel VIH en la gestant implica *per se* risc de prematuritat i de baix pes al néixer (*Leroy 1998*). En les mares en tractament ARV s'ha obtingut resultats contradictoris. Vàries publicacions apunten una major incidència de prematuritat i baix pes en les gestants en TAR respecte a les que reben monoteràpia, especialment quan el TAR s'inicia previ a la gestació o en el primer trimestre i especialment també en els règims que contenen IP (*European Collaborative Study 2000*)(*Thorne 2004*)(*Grosch-Woerner 2008*)(*Sibiude 2012*)(*Watts 2013*). Altres estudis, que exclouen altres factors obstètrics que poden desencadenar parts preterme, no observen diferències entre les gestants en TAR i

la població general (Patel 2010) (Lopez 2012), únicament una major prematuritat en les mares que prenen IPs (Kourtis 2007). Pel que fa a altres events obstètrics desfavorables, alguns autors observen un risc més elevat de malaltia hipertensiva en la gestant VIH positiva que en la població general, sobretot si s'ha iniciat TAR abans de la gestació (Suy 2006)(Stankiewicz 2014), mentre que la revisió de cohorts més grans i de meta-anàlisis no observen aquest risc (Toumala 2005)(Calvert 2013).

7.2.3.- Risc d'infeccions i desenvolupament de la immunitat

Estudis de cohorts africanes i índies revelen una major morbi-mortalitat per infeccions entre els pacients ENI, relacionades amb una major immunodepressió en la mare (Marinda 2007)(Singh 2011)(Slogrove 2012). En el nostre medi, amb major accessibilitat al sistema sanitari i menys amuntegament, existeixen estudis que apunten a una major incidència d'infeccions bacterianes potencialment greus, com sepsis neonatals per estreptococ del grup B (Epalza 2010) o infeccions per bacteris encapsulats en el primer any de vida, en relació a una menor xifra de CD4+ materns (Taron-Brocard 2014). A part d'una immunitat humoral insuficient per menor pas transplacentari d'IgG materns, la limfopènia, l'alteració del fenotip de les cèl·lules dendrítiques, la disminució de limfòcits T memòria, la menor mida del timus, l'alteració en la producció de citocines inflamatòries i l'augment de l'apoptosi de limfòcits semblen tenir-hi un paper. Tots aquestes alteracions, a part de la malaltia materna, poden ser secundàries a l'exposició a antígens del VIH, a coinfeccions, com el CMV, o a l'exposició a TAR (Afran 2013)(Taron-Brocard 2014).

7.3.- Toxicitat hematològica

7.3.1.- Manifestacions clíniques i analítiques

La infecció pel VIH en si mateixa pot desencadenar una àmplia varietat de patologia hematològica, que s'estén des de citopènies a neoplàsies (Volverding 2003). Aquest ventall s'amplia amb l'efecte tòxic dels ARV sobre les cèl·lules sanguínies, fenomen àmpliament reportat en la literatura (Richman 1987)(Sullivan 1998)(Sloand 2005).

El fàrmac més implicat en la toxicitat hematològica secundària a ARV és la ZDV, que s'associa a anèmia macrocítica principalment i a neutropènia (Richman 1987)(Koch 1992)(Volverding 2003).

En el context de la PTV, ja en l'estudi 076 de l'AIDS Clinical Trial Group es va observar una menor hemoglobina mitja en els pacients exposats a ZDV, que no implicava una major necessitat d'interrupció de tractament o de transfusió (Sperling 1998). Múltiples revisions posteriors han coincidit en observar aquesta anèmia amb

una prevalença elevada (25,8-53,8% segons la sèrie presenta anèmia grau ≥ 2 de la DAIDS) (Feiterna-Sperling 2007)(Fernandez-Ibieta 2008). Malgrat se n'ha descrit formes fetals i neonatals precoces d'elevat risc vital (Watson 1998)(Myers 2005), la seva intensitat és habitualment lleu i no implica major requeriment transfusional ni necessitat d'interrompre la profilaxi neonatal. És macrocítica en tots els casos i transitòria, ja que es resol de forma espontània entorn els 3 mesos de vida (Sperling 1998) (Le Chenadec 2003) (Bunders Acta Ped 2005) (Fernandez Ibieta 2008). En algun estudi s'ha associat a la durada de l'exposició a ZDV (Le Chenadec 2003) (Briand 2010) i a la intensitat de la pauta d'ARV utilitzada (El Beitune 2006)(Feiterna-Sperling 2007) (Baroncelli 2010).

Pel que fa als neutròfils, en varies cohorts s'ha observat menors xifres de neutròfils en pacients ENI que en pacients no exposats (Le Chenadec 2003)(Bunders Acta Ped 2005) (Pacheco 2006)(Feiterna Sperling 2007). Aquesta reducció de neutròfils sembla ser lleu, sense rellevància clínica i de major durada que l'anèmia, en tant que se n'ha observat persistència fins als 8 anys d'edat (European Collaborative Study 2004). La neutropènia sembla estar relacionada amb el temps d'exposició a ARV i amb la intensitat del tractament.

Els limfòcits tenen un comportament diferent segons el subtipus. S'ha observat una reducció clara dels limfòcits T col·laboradors o CD4+ els primers mesos de vida en múltiples sèries de pacients exposats, que es correlaciona amb el grau d'activitat de la infecció pel VIH en la mare (major càrrega viral, menor xifra de CD4+ materns) i no amb l'exposició a ARV (Le Chenadec 2003)(Bunders AIDS 2005). D'altra banda, els limfòcits T citotòxics o CD8+ semblen tenir un comportament comparable al dels neutròfils, ja que se'n reporta una reducció perllongada en el temps (fins als 8 anys d'edat), relacionada també amb la intensitat i la durada de l'exposició a ARV i sense repercussió clínica en els períodes estudiats (Bunders AIDS 2005)(Pacheco 2006).

La repercussió en les xifres de plaquetes de l'exposició a ARV és poc rellevant i amb dades contradictòries, ja que mentre algunes sèries n'observen menors xifres (Le Chenadec 2003)(Pacheco 2006), altres en reporten increment (Feiterna Sperling 2007).

7.3.2: Mecanismes fisiopatològics implicats

Múltiples estudis realitzats en cultius cel·lulars in vitro demostren que l'exposició de precursors hematopoètics humans a ZDV té un efecte inhibidor en la seva replicació, dosi dependent (Somadossi 1987). Les línies eritroides són les més sensibles, en ser afectades a molt menor dosi de ZDV que els precursors granulocitaris i monocítics (Dainiak 1988)(Shah 1996)(Gribaldo 2000)(Lewis 2004). Els precursors fetals semblen ser més sensibles (Shah 1996).

Diferents mecanismes moleculars semblen estar implicats en la fisiopatologia d'aquesta toxicitat, com la disminució de la síntesi de globines (Weidner 1990)(Spiga 1999), de receptors de factors de creixement com l'eritropoetina (Gogu 1992) o el GM-CSF (Chitnis 2002) i de factors de transcripció com GATA-1 (Bridges 1996) (Spiga 1999) o NFE-2 (Bridges 1996). D'altra banda alguns estudis han detectat signes de disfunció mitocondrial en els precursors hematopoètics que podrien derivar de la inhibició de la γ -polimerasa descrita en els ITIANs. Així doncs, s'ha reportat elevació de lactat i reducció de la ratio ADNmt/ADNn en els cultius cel·lulars exposats a ZDV (Hobbs 1992)(Lewis 2004); tot i que altres observen que aquest mecanisme té un pes important en la toxicitat d'altres ITIANs però no en la ZDV (Faraj 1994). Fins l'actualitat no es disposa d'estudis moleculars més exhaustius que permetin dilucidar de forma més exacta el paper de la disfunció mitocondrial en aquest context. L'elevada sensibilitat de la sèrie eritrocitària a la toxicitat per ZDV sembla estar relacionada amb l'alta dependència de la producció d'hemoglobina i per tant de grup hemo en la mitocondria dels precursors eritroides. Així doncs s'ha descrit una reducció significativa de l'activitat de l'enzim àcid δ -aminolevulínic sintasa (ALAS) en cèl·lules de rata exposades in vitro a ZDV (Lutton 1990), enzim crític en la síntesi del grup hemo. Amb finalitats compensatòries, augmenta l'activitat del receptor de transferrina (D'Alessandro 1999) conduint a una sobrecàrrega intracel·lular de ferro o hemosiderosi (Pollack 1993) que interfereix en les funcions cel·lulars i mitocondrials bàsiques. Aquest mecanisme molecular és, a menor escala, el mateix que es dona en les anèmies sideroblàstiques hereditàries (Comaschella 2009).

7.4.- Toxicitat mitocondrial

7.4.1.- Clínica

L'any 1998 fou publicat un cas d'acidosi làctica en un nadó de 9 dies de vida en profilaxi amb ZDV, que es va resoldre en interrompre el tractament (Scalfaro 1998). Un any més tard Blanche i cols. dispararen les alarmes sobre el risc de toxicitat mitocondrial en fills de mare infectada exposats al VIH i a ARV, en publicar una sèrie de 8 casos de pacients amb disfunció mitocondrial persistent detectada mesos després de l'exposició a ARV (Blanche 1999). El grup d'estudi de la cohort perinatal francesa va reportar l'any 2002 una major incidència de convulsions febrils en pacients exposats en comparació a controls sans (Landreau-Mascaro 2002) i un any després, a partir de la revisió de pacients amb manifestacions clíniques que podrien correspondre a disfunció mitocondrial, van estimar una incidència de malaltia mitocondrial del 0,26% en els pacients exposats, significativament major a la de la població general (Barret 2003). Pel mateix

mètode de revisió, Brogly i cols. comuniquen una sèrie de 20 casos de pacients amb clínica que podria ser secundària a disfunció mitocondrial (Brogly 2007) malgrat anys després en publiquen els estudis de funció mitocondrial, on no s'observa diferències significatives respecte als controls (Brogly 2011).

En resposta a aquestes alarmes de iatrogènia, varies publicacions de revisió retrospectiva de cohorts amb un elevat nombre de lactants exposats a VIH i ARV no van detectar en les històries manifestacions clíniques suggestives de malaltia mitocondrial (Culnane 1999)(Bulterys 2000)(Dominguez 2000) (European Collaborative Study 2003). D'altra banda foren revisades les causes d'èxitus de pacients exposats, sense detectar possibles casos de patologia mitocondrial (Lindegren 2000). Cal tenir present que en cap d'aquest estudis es disposava de dades de laboratori que descartessin la presència de disfunció mitocondrial.

L'any 2005 Tovo i cols. comuniquen un cas d'encefalomiopatia mitocondrial confirmada per biòpsia muscular en un pacient exposat a VIH i ARV, que a diferència de les citopaties mitocondrials hereditàries no va cursar amb deteriorament progressiu (Tovo 2005). Tot i l'alarma generada i l'evidència bioquímica de toxicitat mitocondrial secundària a ARV, no s'ha comunicat altres casos similars. Com s'explica posteriorment, l'estudi de funció mitocondrial en pacients exposats a VIH i ARV s'ha anat profunditzant amb complexes tècniques de laboratori. A destacar que en les sèries publicades els darrers anys no es reporta cap pacient amb clínica suggestiva de malaltia mitocondrial.

Pel seu alt requeriment energètic, un dels teixits en què la disfunció mitocondrial podria ser manifesta és en el miocardi. L'estudi sistemàtic de la funció i estructura cardíaca de pacients ENI en comparació a pacients no exposats ha revelat la presència de canvis subclínic en l'estructura, contractilitat cardíaca i funció diastòlica, que es relacionen amb l'exposició a fàrmacs ARV in utero (Lipshultz 2011)(Code 2012)(Lipshultz 2015).

7.4.2.- Disfunció mitocondrial en estudis de laboratori

Malgrat en humans ENI no és possible la mesura de la funció mitocondrial en els teixits diana, disposem d'estudis realitzats en animals que en confirmen la seva alteració en fetge, miocardi i sistema nerviós central d'individus exposats de forma prenatal a ARV. Aquestes alteracions comprenen alteracions morfològiques, funcionals i de contingut d'ADNmt de la mitocòndria (Gershenson 2004)(Divi 2010).

La hiperlactacidèmia, reflex de disfunció mitocondrial, és una troballa freqüent en els ENI (incidència 43-92% segons les sèries); transitòria, ja que es resol setmanes o

mesos després de finalitzar l'exposició i cursa majoritàriament de forma asimptomàtica (*Giaquinto 2001*)(*Alimenti 2003*)(*Noguera 2004*)(*Ekouevi 2006*)(*Fernandez 2010*).

Múltiples estudis en els darrers anys han anat aprofundint en les bases bioquímiques d'aquesta disfunció en el cas concret dels ENI.

Probablement el comportament de la funció mitocondrial sigui diferent en teixits materns, sotmesos a part del TAR, al VIH i a la reacció inflamatòria que aquest genera, que en el fetus no infectat fora de l'acció patogènica del virus. Així, varis estudis realitzats en mostres de placenta i cordó umbilical coincideixen en observar una depleció d'ADNmt en els pacients exposats a VIH i ARV en comparació a controls sans (*Shiramizu 2003*) (*Divi 2004*) (*Gingelmaier 2009*)(*Ross 2012*) i alteracions morfològiques de la mitocòndria (*Divi 2004*)(*Divi Leonard 2007*). A nivell transcripcional, s'observa una menor ràtio COXII/IV en el teixit placentari (*Gingelmaier 2009*). Aquests resultats són equiparables als observats en pacients adults infectats naïfs (*Côté 2002*) (*Casula 2005*) (*Maagaard HIV Med 2006*) i en TAR (*Miró 2003*)(*Miró JAIDS 2004*)(*McComsey 2005*) (*Kampira 2014*). En l'anàlisi de CMSP de pacients infectades pel VIH s'obtenen resultats similars, amb nivells d'ADNmt i activitats enzimàtiques disminuïts en comparació a controls sans (*Aldrovandi 2009*)(*Hernandez 2012*).

L'obtenció de sang de cordó umbilical en el moment del naixement és una forma molt incruenta d'obtenir mostres que ha estat utilitzada en diferents treballs, no obstant és una mostra menys fiable en tant que pot haver-hi barreja de sang materna i fetal. En aquest tipus de mostra de nounats ENI s'ha observat de forma consistent una disminució de l'ADNmt en comparació a no exposats (*Poirier 2003*)(*Shiramizu 2003*)(*Divi 2004*) (*Ross 2012*)(*Hernandez 2012*), així com una disminució de la síntesi de subunitats proteiques dependents de l'ADNmt, amb menor ràtio COXII/COXIV (*Ross 2012*).

En sang perifèrica del pacient ENI, els resultats en quant a contingut d'ADNmt són contradictoris. Alguns estudis n'observen menor quantitat en els exposats fins als 2 anys de vida (*Poirier 2003*)(*Aldrovandi 2009*) mentre que altres n'han comunicat un augment (*McComsey 2008*)(*Cte 2008*)(*Ross 2012*), que es manté fins uns mesos després de finalitzar l'exposició (*Cté 2008*). En un dels estudis s'ha trobat una relació significativa entre el temps d'exposició a ZDV+3TC, i la no exposició a ddI i d4T amb nivells significativament majors d'ADNmt (*Cté 2008*). Aquestes troballes són congruents amb dades obtingudes en l'experimentació in vitro que demostren que alguns ITIANs (ZDV, 3TC, FTC i ABC) desencadenen augment del contingut d'ADNmt com a mecanisme de compensació davant de la toxicitat mitocondrial i l'estrès oxidatiu (*Lee 2000*) (*de Baar 2007*). D'altra banda s'ha observat in vitro que en una primera fase l'exposició a ZDV

genera una resposta compensadora d'augment d'ADNmt mentre que en fases més avançades en desencadena el descens, així com lesions en la morfologia mitocondrial (*Divi Haverkos 2007*).

Ja des d'un punt de vista més qualitatiu, s'ha observat una major incidència de mutacions AC/TG en l'ADNmt de gestants infectades i nadons ENI respecte a controls sans, de repercussió incerta a llarg termini, per la seva possible implicació en l'envelliment i les malalties senils (*Jitratkosol 2012*). No s'ha observat diferències en quant a delecions d'ADNmt respecte a controls sans (*Brogly 2011*) i tampoc en la longitud telomèrica (*Poirier 2003*)(*Imam 2012*). Únicament un estudi ha quantificat l'ARNmt i n'ha reportat una disminució entre els pacients exposats a les 48 hores de vida (*Côté 2008*) que es recupera malgrat persisteix augment relatiu de l'ADNmt dels ENI respecte els controls sans.

En els escassos estudis en què s'ha mesurat la ràtio COXII/IV en sang perifèrica no s'ha detectat diferències (*McComsey 2008*) (*Ross 2012*).

Fins l'actualitat no es disposa d'estudis de funció mitocondrial (activitats enzimàtiques de la cadena respiratòria mitocondrial) en sang perifèrica de pacients exposats al VIH no infectats.

Una limitació important de tots aquests estudis és la dificultat de definir o determinar la influència del VIH i la del TAR en la disfunció mitocondrial.

En l'únic estudi que es disposa d'un grup de fills de mare infectada pel VIH no exposats a ARV s'observa menor ADNmt en aquest subgrup de pacients en comparació als ENI. En aquest mateix estudi, tots els pacients exposats a ARV tenen nivells d'ADNmt també menors als controls sans, essent la depleció mínima en aquells pacients exposats a TAR combinat (*Aldrovandi 2009*). Així doncs, a part dels ARV, l'exposició a una infecció activa de la mare té un paper en el metabolisme mitocondrial del nadó i probablement la CrV materna es correlacioni de forma negativa amb els nivells d'ADNmt. Per qüestions ètiques i en absència de mostres anteriors a la instauració de protocols de PTV, no es disposa d'altres estudis que puguin contrastar aquestes dades.

II. Justificació i hipòtesis

JUSTIFICACIÓ

El tractament amb fàrmacs antiretrovirals com a part de la prevenció de la transmissió vertical del VIH ha demostrat ser altament efectiu, i ha aconseguit reduir la taxa de transmissió fins a xifres inferiors al 1%.

No obstant, l'exposició al tractament antiretroviral (TAR) no està exempta d'efectes adversos, com reflexa l'elevada prevalença d'alteracions hematològiques, especialment d'anèmia durant les primeres setmanes de vida, entre els nens exposats al VIH i al TAR de les seves mares.

Els protocols de PTV es troben en constant evolució. Al principi, l'estudi ACTG076 incloïa ZDV en monoteràpia a partir de la setmana 28 d'embaràs, en el part per via endovenosa i al nونات durant 6 setmanes. Actualment, el TAR que combina almenys tres fàrmacs ARV d'almenys 2 famílies diferents està indicat en totes les gestants per a la seva pròpia salut i per a la PTV. En les mares que es troben sense tractament a l'inici de la gestació, es recomana iniciar el TAR a partir de la setmana 14. L'objectiu del TAR és assolir un control complet de la replicació viral abans de la setmana 32 d'embaràs. D'aquesta manera, la gestant arriba al part amb càrrega viral indetectable i, si les condicions obstètriques són favorables, pot finalitzar la gestació per part vaginal. És evident doncs que les recomanacions actuals suposen una exposició del fetus a un nombre major de fàrmacs ARV, durant un temps més perllongat. En el nadó exposat fill d'una mare que ha fet un seguiment i tractament correctes durant la gestació, la durada de la profilaxi neonatal amb ZDV s'ha escurçat de 6 a 4 setmanes.

En aquest context, és fonamental desenvolupar tota l'evidència científica possible sobre els riscos del fetus exposat a fàrmacs ARV, amb la intenció de que els protocols de PTV assoleixin la màxima eficàcia amb la mínima toxicitat possible.

Múltiples estudis *in vitro* que ens han aproximat a les bases fisiopatològiques de l'anèmia per ZDV aporten evidència de la seva naturalesa multifactorial. Un dels factors implicats sembla ser la disfunció mitocondrial, si bé no hi ha estudis en pacients exposats no infectats que ho corroborin.

L'associació de l'exposició a fàrmacs ARV, especialment de la família dels ITIANs, i disfunció mitocondrial ha estat àmpliament descrita en pacients infectats pel VIH en TAR.

També en el fill de mare amb infecció pel VIH exposat a ARV s'ha descrit toxicitat en el metabolisme mitocondrial, si bé de forma encara incompleta. La càrrega de iatrogènia que pot comportar aquesta disfunció, en pacients d'altra banda sans, és de dimensions encara no quantificables en l'actualitat ja que:

- Se'n desconeixen els mecanismes bioquímics subjacents amb profunditat.
- La repercussió clínica d'aquesta disfunció sembla ser mínima en els primers anys de vida, i esdevé molt complexe tant preveure-la com mesurar-la. A més, no hi ha registres d'aquestes persones que en permetin el seguiment a llarg termini.
- No coneixem les conseqüències clíniques que pot comportar a llarg termini, per la curta edat de l'epidèmia i, més específicament, de les mesures de PTV, contínuament canviants. Cal recordar que els primers nadons exposats a ARV durant la gestació i el període neonatal tenen actualment 21 anys.
- La mitocòndria és un orgànul de gran complexitat i amb un paper fonamental en l'homeòstasi cel·lular i en la fisiopatologia de malalties degeneratives, neoplàsiques i en els fenòmens d'envelliment. Desconeixem si l'exposició a fàrmacs ARV en els períodes fetal i neonatal pot suposar una menor reserva de funció mitocondrial per a la vida adulta.

HIPÒTESIS

- L'ús de fàrmacs ARV de nova generació i l'escurçament de la profilaxi neonatal amb ZDV de 6 a 4 setmanes poden haver reduït la toxicitat hematològica en els lactants ENI.
- El metabolisme mitocondrial de la gestant infectada pel VIH en TAR presenta alteracions genètiques i funcionals que poden correlacionar-se amb troballes equivalents en el nounat ENI.
- L'exposició precoç a ARV afecta el metabolisme mitocondrial del lactant ENI, a nivell genètic i funcional. Aquestes alteracions poden resoldre's espontàniament durant els primers mesos de vida, després de finalitzar l'exposició del pacient a fàrmacs ARV.
- La toxicitat hematològica observada en els lactants ENI en el primer any de vida podria associar-se a les alteracions del metabolisme mitocondrial.

III. Objectius

ARTICLE 1:

Antiretroviral-related hematologic short-term toxicity in healthy infants.

Implications of the new neonatal 4-week zidovudine regimen.

Lahoz R, Noguera-Julian A, Rovira N, Català A, Sánchez E, Jiménez R, Fortuny C. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2010, Volum 29 (4): 376-79.

- Determinar si la reducció de la durada de la profilaxi neonatal amb zidovudina de 6 a 4 setmanes en el context de la prevenció de la transmissió vertical s'associa a una menor toxicitat hematològica en el primer any de vida en els pacients exposats a VIH no infectats (ENI).
- Determinar quins fàrmacs del TAR matern es relacionen amb la toxicitat hematològica observada.

ARTICLE 2:

Influence of new antiretrovirals on hematological toxicity in HIV-exposed uninfected infants.

Rovira N, Noguera-Julian A, Rives S, Berrueco R, Lahoz R, Fortuny C.

European Journal of Pediatrics, en premsa.

- Analitzar si els canvis en els règims TAR en les gestants amb infecció VIH al llarg del temps han tingut impacte en la toxicitat hematològica dels lactants ENI.

ARTICLE 3:

Mitochondrial disturbances in HIV pregnancies.

Morén C, Noguera-Julian A, Garrabou G, Rovira N, Catalán M, Bañó M, Guitart-Mampel M, Tobías E, Hernández S, Cardellach F, Miró Ò, Fortuny C.

AIDS 2015, 29: 5-12

- Descriure la funció mitocondrial en gestants infectades pel VIH i en tractament ARV i als seus fills ENI, tant a nivell genètic com funcional.
- Determinar si els marcadors de funció mitocondrial es relacionen amb les variables maternes i perinatals.

ARTICLE 4:

Decreased mitochondrial function among healthy infants exposed to antiretrovirals during gestation, delivery and the neonatal period.

Noguera-Julian A, Morén C, Rovira N, Garrabou G, Catalán M, Sánchez E, Cardellach F, Miró Ò, Fortuny C.

The Pediatric Infectious Disease Journal 2015, Volum 34 (12): 1349-54

- Descriure el metabolisme mitocondrial en pacients ENI durant els primers 12 mesos de vida (nivells de DNA mitocondrial i funció enzimàtica de la cadena respiratòria mitocondrial).
- Determinar l'associació entre els nivells d'ADNmt, la funció enzimàtica i l'exposició a ARV durant l'embaràs i el període neonatal.

ARTICLE 5:

Mitochondrial dysfunction partially explains macrocytic anemia in HIV-exposed uninfected infants.

Rovira N, Noguera-Julian A, Morén C, Garrabou G, Lahoz R, Catalan M, Guitart M, Miró Ò, Fortuny C.

En valoració a la Revista AIDS Research and Therapy

- Analitzar la relació entre les variables del metabolisme mitocondrial, genètiques i funcionals, i els valors hematològics durant el primer any de vida en lactants ENI.

IV. Resultats

ARTICLE 1

***Antiretroviral-related hematologic short-term toxicity in healthy infants.
Implications of the new neonatal 4-week zidovudine regimen.***

Rebeca Lahoz, Antoni Noguera-Julian, Núria Rovira, Albert Català, Emília Sánchez,
Rafael Jiménez, Clàudia Fortuny.

The Pediatric Infectious Disease Journal 2010, Volum 29 (4): 376-79.

However, the European RSV hospitalization predictive model proved robust to external validation and the diagnostic accuracy remained satisfying. Recently, such a RSV risk-scoring tool based on information on the same 7 RSV risk factors was evaluated in Canadian infants 33 to 35 wGA and was found to be practical and effective in reducing RSV hospitalization in infants who are most at risk, while avoiding prophylaxis in the 82% of the GA cohort who were considered low risk for RSV infection.⁹ In countries like Denmark without RSV prophylaxis guidelines for premature infants and where the use of RSV prophylaxis is based solely on individual judgment, a risk-scoring model might improve the use and efficacy of RSV prophylaxis.

CONCLUSION AND PERSPECTIVE

This external validation of the European RSV predictive model confirmed the robustness of the model. Based on the model, computer software could be developed and offered to European neonatal departments to optimize the cost-effectiveness of the use of passive prophylaxis against RSV in premature infants born 33 to 35 wGA.

REFERENCES

1. Law BJ, Langley JM, Allen U, et al. The Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada study of predictors of hospitalization for respiratory syncytial virus infection for infants born at 33 through 35 completed weeks of gestation. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:806–814.
2. Connor EM; The IMPact-RSV Study Group. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants [see comments]. *Pediatrics*. 1998;102:531–537.
3. Wang D, Cummins C, Bayliss S, et al. Immunoprophylaxis against respiratory syncytial virus (RSV) with palivizumab in children: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2008;12:iii, ix–x, 1–86.
4. Figueras-Aloy J, Carbonell-Estrany X, Quero J. Case-control study of the risk factors linked to respiratory syncytial virus infection requiring hospitalization in premature infants born at a gestational age of 33–35 weeks in Spain. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:815–820.
5. Simoes EA, Carbonell-Estrany X, Fullarton JR, et al. A predictive model for respiratory syncytial virus (RSV) hospitalization of premature infants born at 33–35 weeks of gestational age, based on data from the Spanish FLIP Study. *Respir Res*. 2008;9:78.
6. Olsen J, Melbye M, Olsen SF, et al. The Danish National Birth Cohort—its background, structure and aim. *Scand J Public Health*. 2001;29:300–307.
7. Stensballe LG, Kristensen K, Simoes EA, et al. Atopic disposition, wheezing, and subsequent respiratory syncytial virus hospitalization in Danish children younger than 18 months: a nested case-control study. *Pediatrics*. 2006;118:e1360–e1368.
8. Carbonell-Estrany X, Figueras-Aloy J, Law BJ. Identifying risk factors for severe respiratory syncytial virus among infants born after 33 through 35 completed weeks of gestation: different methodologies yield consistent findings. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:S193–S201.
9. Paes B, Steele S, Janes M, et al. Risk-scoring tool for respiratory syncytial virus prophylaxis in premature infants born at 33–35 completed weeks' gestational age in Canada. *Curr Med Res Opin*. 2009;25:1585–1591.

ANTIRETROVIRAL-RELATED HEMATOLOGIC SHORT-TERM TOXICITY IN HEALTHY INFANTS

IMPLICATIONS OF THE NEW NEONATAL 4-WEEK ZIDOVUDINE REGIMEN

Rebeca Lahoz, MD,* Antoni Noguera, MD, PhD,*
Núria Rovira, MD,* Albert Català, MD,* Emilia Sánchez, MD, PhD,†
Rafael Jiménez, MD, PhD,* and Clàudia Fortuny, MD, PhD*

Abstract: Recent updates of the guidelines on the prevention of human immunodeficiency virus mother-to-child transmission have shortened the

neonatal zidovudine prophylactic regimens from 6 to 4 weeks. We present a prospective observational study in a large cohort of mother-infant pairs and report that the 4-week regimen allows an earlier recovery of the anemia in these otherwise healthy infants.

Key Words: hematologic toxicity, human immunodeficiency virus, neonatal prophylaxis, pediatrics, zidovudine
Accepted for publication October 27, 2009.

From the Departments of *Pediatrics, and †Hematology, Pediatric Infectious Diseases Unit, Hospital Sant Joan de Déu-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; and ‡Catalan Agency for Health Technology Assessment and Research, Barcelona, Spain.

Address for correspondence: Antoni Noguera, MD, PhD, Infectious Diseases Unit, Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain. E-mail: ton@hsjdbcn.org. Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.pidj.com). DOI: 10.1097/INF.0b013e3181c81fd4

Mother-to-child transmission (MTCT) of human immunodeficiency virus (HIV) in developed countries has decreased to <2% after the implementation of prophylactic measures, such as the use of antiretrovirals (ARV), elective cesarean section, and refraining from breast-feeding.^{1–3} Exposure of these otherwise healthy infants to one or more drugs of unknown toxicity is of concern. To date, most of the reported hematologic and mitochondrial adverse effects, of which zidovudine (ZDV)-related reversible anemia is the most common, have shown mild clinical significance.^{4–8}

After the PACTG 076 study,⁹ the 6-week neonatal oral ZDV chemoprophylaxis regimen became standard care. Since 2005, HIV-exposed neonates in the United Kingdom have been treated for 4 weeks,³ in accordance with postexposure prophylaxis (PEP) guidelines in other situations.¹⁰ We investigated whether the new 4-week neonatal ZDV regimen has led to a decrease in hematologic toxicity in a large cohort of HIV-uninfected infants.

MATERIALS AND METHODS

A single-center prospective observational study was conducted in a cohort of mother-infant pairs, followed up prospectively from January 2000 in a tertiary-care pediatric hospital in Barcelona (Spain). Informed consent was obtained from all women at enrollment and the study protocol was approved by the local Ethics Committee. As per protocol, demographic, clinical, and laboratory data are routinely collected on all patients, and a complete clinical examination and blood tests were performed at every visit (at 2, 3, and 6 weeks, and at 3, 6, and 12 months of age). Laboratory tests included a full blood picture and a viral load assay (proviral HIV-DNA, Amplicor HIV until year 2003, and HIV-RNA quantification, CA HIV Monitor, thereafter; Roche, Basel, Switzerland).

HIV-exposed uninfected infants were eligible if they had been exposed to ARV during gestation and had received ZDV monotherapy during the neonatal period. According to current guidelines,¹ an infant was defined as HIV-uninfected if 2 or more viral load tests were negative, with one test at age 1 month or older and one test at age 4 months or older. The following exclusion criteria were used: hepatitis C virus (HCV) infection, gestational age at birth less than 36 weeks, and the presence of any other medical condition capable of causing hematologic disorders.

Patients were initially defined according to the length of their neonatal ZDV treatment period, a 6-week regimen or a 4-week regimen, according to current guidelines at the time of birth. A univariate assessment of differences in toxicity between the 2 groups

was conducted using the χ^2 test for categorical variables and the *t* test for continuous variables. Multivariate regression analyses controlling for several factors known to be associated with hematologic variables (maternal age, ethnicity, drug use, CD4 cell count and plasma viral load, type and length of ARV regimens during pregnancy, and the infant's sex, gestational age, and weight at birth) were used to assess the association between the different ARV treatment regimens and the outcome variables. All tests were 2-tailed, and a *P* value <0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed with the SPSS 12.0 Program.

RESULTS

As of June 2008, 221 infants had been enrolled in the cohort. Among these, 50 patients were excluded because of: neonatal ARV prophylaxis other than ZDV monotherapy (*n* = 13), HIV infection (*n* = 5, all of them diagnosed during the first week of life), hepatitis C virus infection (*n* = 11), gestational age at birth less than 36 weeks (*n* = 10), and other medical conditions (*n* = 11). The final study cohort consisted of 171 patients (80 women, 46.8%). Overall, 138 patients (80.7%) received a 6-week neonatal regimen of oral ZDV, while 33 (19.3%) received the new 4-week regimen. Most of the children in the latter group were born from 2005 onwards. All children were exclusively bottle-fed and none received prophylactic trimethoprim-sulfamethoxazole.

Data regarding gestation, birth, and neonatal clinical variables are summarized in the Table, Supplemental Digital Content

1, <http://links.lww.com/INF/A334>. At delivery, mothers in the 6-week ZDV group were significantly younger (*P* = 0.022), and had been treated more often with stavudine (34% vs. 12%, *P* = 0.015) and neftinavir (36% vs. 12%, *P* = 0.008) and less often with emtricitabine (0% vs. 12%, *P* = 0.001), abacavir (4% vs. 15%, *P* = 0.039), and tenofovir (1% vs. 12%, *P* = 0.014) as part of their highly active antiretroviral therapy (HAART) regimens.

Lower mean hemoglobin values (12.1 vs. 13.1 g/dL; *P* = 0.006) and a higher rate on all Division of Acquired Immunodeficiency Syndrome toxicity grades¹¹ in hemoglobin concentrations (76% vs. 48%; *P* = 0.005) at the age of 2 to 3 weeks were observed in infants whose mothers had received ZDV as part of their HAART regimens during pregnancy. These findings persisted in multivariate analyses (odds ratio: 4.28 for any toxicity in hemoglobin values when ZDV was included in maternal therapy; 95% confidence interval [CI]: 1.01–18.05; *P* = 0.048). No other differences in baseline characteristics or associations between those and hematologic findings were observed (data not shown).

Overall, no statistically significant differences were observed in hemoglobin, mean corpuscular volume (MCV), neutrophil, lymphocyte, and platelet counts (Figs. 1A–E) between the 2 groups, except for MCV values at 6 weeks and 3 months of age, which were lower in the 4-week ZDV group (*P* < 0.0001 and *P* = 0.002, respectively; Fig. 1B). In both groups, mean MCV was higher than reference values up to the age of 6 weeks and later became normal. Changes over time in significant abnormalities

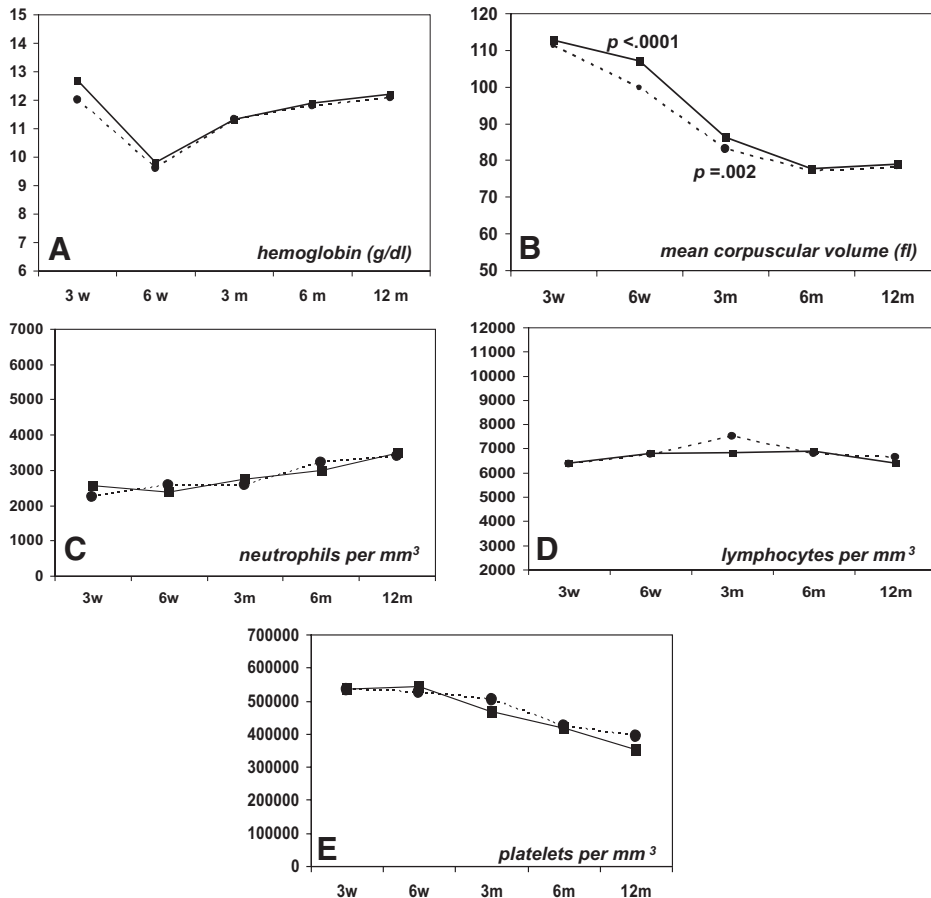


FIGURE 1. A to E, Changes over time of the different hematologic parameters according to the length of the neonatal zidovudine regimen, 6 weeks (solid line) or 4 weeks (dotted line).

(according to the Division of Acquired Immunodeficiency Syndrome pediatric grading system¹¹) of hemoglobin values and neutrophil counts were similar irrespective of the length of the neonatal ZDV regimen. Normal lymphocyte and platelet counts at all ages were observed for all infants in the study. In the multivariate assessment, differences in MCV at 6 weeks ($P < 0.0001$) and 3 months ($P = 0.013$) of life were confirmed, and no other significant results were found. Hematologic toxicity did not lead to clinical symptoms in any case; no blood transfusions or treatment discontinuation were required.

DISCUSSION

Currently, most HIV-infected pregnant women receive HAART. When feasible, use of ZDV as a component of the maternal HAART is recommended, as is the intrapartum intravenous ZDV regimen. ZDV also remains the drug of choice in postpartum neonatal chemoprophylaxis.¹⁻³ The 4-week neonatal chemoprophylaxis regimen was first recommended in 2005 by the British guidelines³ and has recently been implemented in Spain.² The optimal duration of neonatal ZDV chemoprophylaxis has not been appropriately established. A recent clinical trial in Thailand on the prevention on MTCT that used maternal ZDV starting at 28 weeks of pregnancy, plus a loading dose of ZDV during labor, single-dose nevirapine in the mother and the infant, and a 7-day neonatal ZDV treatment achieved a 2% rate of HIV MTCT.¹² Although not specifically designed to answer this question, these results suggest that shorter neonatal regimens are as effective as the 6-week regimen in the PACTG 076 TRIAL.

Large cohort studies in Europe and the United States indicate that perinatal exposure to ARV drugs is associated with minor and mostly clinically insignificant decreases in several hematologic parameters, including hemoglobin concentrations and platelet, lymphocyte, CD4 and CD8 cell, and neutrophil counts.^{4-6,13,14} Except for hemoglobin, these differences may persist through the age of 18 to 24 months,⁴⁻⁶ or even longer for neutrophil¹³ and lymphocyte counts.¹⁴ In general, the use of HAART during pregnancy and a longer duration of exposure lead to larger decreases.^{4,7,14} The observational nature of our study, the small sample size, the lack of a control group of ARV-unexposed infants, and the fact that, overall, 93% of the mothers received HAART during pregnancy did not allow us to confirm these findings. Nonetheless, the absence of differences in most hematologic indices when the length of the neonatal ZDV regimen was taken into account suggests that this toxicity is mainly due to the use of ARV during pregnancy. The use of historic controls instead of concurrent ones could represent a potential for bias and limit the validity of the study; however, there were no dissimilarities in the baseline characteristics, the endpoints were objective and adequate data were available to allow for the comparison between both regimen groups.

Short-term toxicity of infant ZDV prophylaxis has been minimal, consisting primarily of transient macrocytic anemia. Several studies suggest that hematologic toxicity increases when intravenous ZDV⁵ or combined neonatal ZDV/lamivudine prophylaxis^{5,15} are used, with increasing numbers of patients requiring treatment discontinuation or blood transfusions. The change in hemoglobin value in our study, with a nadir occurring at 6 weeks of age, is similar to that in the PACTG 076 trial.⁹ In contrast with other hematologic parameters, hemoglobin concentrations tend to normalize at 2 to 3 months of age, early after the exposure to any ARV finishes.⁴⁻⁹ The in vitro inhibitory effect of ZDV on hematopoietic progenitors was reported early on by Dainiak et al,¹⁶ and it is more severe on the fetal and neonatal erythroid lineages.¹⁷ Although the lower hemoglobin levels at age 2 to 3 weeks we

describe were only associated with the maternal use of ZDV during gestation, the significant differences in MCV values between groups at 6 and at 12 weeks of age suggest that the 4-week regimen allows an earlier recovery of the erythroid cell lineage in bone marrow.

In conclusion, our results suggest that the use of HAART during pregnancy, especially if this regimen includes ZDV, is critical for the development of neonatal anemia; moreover, the length of the ZDV neonatal regimen likely represents an additive toxic effect. Nowadays, most HIV-infected pregnant women receive HAART. Current guidelines on the prevention of HIV MTCT allow a vaginal delivery when maternal viral load near the time of delivery is below 1000 HIV-RNA copies/mL and recommend an elective cesarean section when maternal viral load near the time of delivery is greater than 1000 HIV-RNA copies/mL,¹ hence minimizing the risk for the newborn to come into contact with contaminated blood and the role of PEP. Likewise, HIV infection may be presumptively excluded by 1 month of age, before the completion of the 6-week PEP.¹ Present PEP guidelines in other situations recommend 4-week regimens of different combined ARV.¹⁰ Whether the neonatal 4-week oral ZDV regimen, or even shorter ones, are as effective as the 6-week regimen in preventing HIV MTCT can only be confirmed by means of a clinical trial. Until then, observational studies with close monitoring of ZDV-exposed infants and assessment of their clinical data contribute to the body of evidence on the effectiveness and safety of the 4-week infant PEP, and provide support for this new recommendation.

REFERENCES

- Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Service Task Force. Perinatal HIV Guidelines Working Group. Recommendations for use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-1-infected women for maternal health and interventions to reduce perinatal HIV-1 transmission in the United States. July 2008. Available at: <http://AIDSinfo.nih.gov>. Accessed September 1, 2009.
- Recomendaciones de la Secretaria del Plan Nacional sobre el Sida, el Grupo de Estudio de Sida, la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia y la Asociación Española de Pediatría para el seguimiento de la infección por el VIH con relación a la reproducción, el embarazo y la prevención de la transmisión vertical. Available at: www.msc.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/publicaciones/publicaciones.htm. Accessed September 1, 2009.
- Ruiter A, Mercey D, Anderson J, et al. British HIV association and children's HIV association guidelines for the management of HIV infection in pregnant women 2008. *HIV Med.* 2008;9:452-502.
- Le Chenadec J, Mayaux MJ, Guihenneuc-Jouyaux C, et al. Perinatal antiretroviral treatment and hematopoiesis in HIV-uninfected infants. *AIDS.* 2003;17:2053-2061.
- Bunders M, Bekker V, Scherpbier HJ, et al. Haematological parameters of HIV-1-uninfected infants born to HIV-1 infected mothers. *Acta Paediatr.* 2005;94:1571-1577.
- Pacheco SE, McIntosh K, Lu M, et al. Effect of perinatal antiretroviral drug exposure on hematologic values in HIV-uninfected children: an analysis of the women and infants transmission study. *J Infect Dis.* 2006;194:1089-1097.
- Feitena-Sperling C, Weizsaecker K, Bühler C, et al. Hematologic effects of maternal antiretroviral therapy and transmission prophylaxis in HIV-1-exposed uninfected newborn infants. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45:43-51.
- Mussi-Pinhata MM, Rego MA, Freimanis L, et al. Maternal antiretrovirals and hepatic enzyme, hematologic abnormalities among human immunodeficiency virus type 1-uninfected infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26:1032-1037.
- Connor EM, Sperling RS, Gelber R, et al; Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *N Engl J Med.* 1994;331:1173-1180.

10. Centers for Disease Control and Prevention. Updated US Public Health Service guidelines for the management of occupational exposures to HIV and recommendations for postexposure prophylaxis. *MMWR Recomm Rep.* 2005;54(RR-9):8.
11. Division of AIDS table for grading the severity of adult and pediatric adverse events. December 2004. (niaid.nih.gov website). Available at: <http://www3.niaid.nih.gov/research/resources/DAIDSClinRsrch/PDF/Safety/DAIDSAEGradingTable.pdf>. Accessed September 1, 2009.
12. Lallemand M, Jourdain G, Le Coeur S, et al. Single-dose perinatal nevirapine plus standard zidovudine to prevent mother-to-child transmission of HIV-1 in Thailand. *N Engl J Med.* 2004;351:217–228.
13. European Collaborative Study. Levels and patterns of neutrophil cell counts over the first 8 years of life in children of HIV-1-infected mothers. *AIDS.* 2004;18:2009–2017.
14. Bunders M, Thorne C, Newell ML; European Collaborative Study. Maternal and infant factors and lymphocyte, CD4 and CD8 cell counts in children of HIV-1-infected mothers. *AIDS.* 2005;19:1071–1079.
15. Mandelbrot L, Landreau-Mascaro A, Rekacewicz C, et al. Lamivudine-zidovudine combination for prevention of maternal-infant transmission of HIV-1. *JAMA.* 2001;285:2083–2093.
16. Dainiak N, Worthington M, Riordan MA, et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) inhibits proliferation in vitro of human haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol.* 1988;69:299–304.
17. Shah MM, Li Y, Christensen RD. Effects of perinatal zidovudine on hematopoiesis: a comparison of effects on progenitors from human fetuses versus mothers. *AIDS.* 1996;10:1239–1247.

MULTIDRUG-RESISTANT ENTEROCOCCUS FAECIUM MENINGITIS IN A TODDLER

CHARACTERIZATION OF THE ORGANISM AND SUCCESSFUL TREATMENT WITH INTRAVENTRICULAR DAPTOMYCIN AND INTRAVENOUS TIGECYCLINE

Heather B. Jaspán, MD, PhD,*† Adam W. Brothers, PharmD,*
 Angela J. P. Campbell, MD,*†‡ John K. McGuire, MD,*†
 Samuel R. Browd, MD, PhD,§ Thomas J. Manley, MD,*†
 Daniel Pak, PharmD,† and Scott J. Weissman, MD*†

Abstract: A case of enterococcal meningitis in a toddler is presented. The organism was highly resistant to all drugs previously used for pediatric Gram-positive meningitis. She was successfully treated with intraventricular and intravenous daptomycin and intravenous tigecycline. The organism was characterized as a member of CC17, a notorious emerging nosocomial clone of *Enterococcus faecium*.

Key Words: vancomycin-resistant *Enterococcus*, tigecycline, daptomycin, meningitis, children

Accepted for publication October 27, 2009.

From the *Department of Pediatrics, Seattle Children's Hospital, Seattle WA; †Department of Pediatrics, University of Washington, Seattle, WA; ‡Fred Hutchinson Cancer Research Institute, Seattle WA; and §Department of Neurological Surgery, Seattle Children's Hospital, Seattle WA.

H.B.J. is supported in part by NIH Training grant 5T32HD007233-28.

Address for correspondence: Heather Jaspán, MD, PhD, Seattle Children's Hospital, 4800 Sandpoint Way NE, Seattle, WA 98105. E-mail: heather.jaspán@sbri.org.

DOI: 10.1097/INF.0b013e3181c806d8

A 21-month-old girl received an HLA-matched, haploidentical peripheral blood stem cell transplant with natural killer cell add-back for treatment of refractory acute bilineage leukemia. She received intense myelosuppression with a total of 14 daily doses of OKT3 (muromonab). On the third post-transplant day, she developed fever. Peripheral blood culture obtained via central venous catheter (CVC) had growth of *Enterococcus faecium* resistant to vancomycin (Table 1, isolate 1). Vancomycin-resistant enterococci (VRE) had been recovered from her stool on routine surveillance one month

TABLE 1. Evolution of the Susceptibilities of the *Enterococcus* Isolates From Blood and CSF

Drug	Isolate 1 Blood Day 0 MIC	Isolate 2 Blood Day 7 MIC	Isolate 3 Blood Day 15 MIC	Isolate 4 CSF Day 25 MIC
Vancomycin	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)
Chloramphenicol*	S	I	I	R
Doxycycline*	S	S	S	R
Linezolid*	S	S	S	R
Synercid*	S	S	S	R
Rifampin*	R	R	R	R
Daptomycin	1 (S)	NT	NT	2 (S)
Tigecycline	NT	0.25 (NI)	0.05 (NI)	0.125 (NI)

* Susceptibility testing for these antimicrobials were performed using disk diffusion method and therefore MICs are not available.

MIC indicates minimum inhibitory concentration; S, susceptible; I, intermediate; R, resistant; NT, not tested; CSF, cerebral spinal fluid; NI, no interpretation available.

earlier. Linezolid was administered intravenously in a dosage of 10 mg/kg every 8 hours, but fever persisted and blood cultures showed growth of *E. faecium*, even after removal of the CVC 4 days after starting antimicrobial therapy. Daptomycin (4 mg/kg every 12 hours) was added to the regimen 6 days after linezolid therapy was initiated. Antibiotic susceptibility testing of the organism was repeated and had not changed since Day 0 (Table 1, isolate 2).

When peripheral blood cultures demonstrated continued growth of VRE, an echocardiogram was obtained, ten days after start of antimicrobial therapy. The study identified echogenic linear foci in the innominate vein, likely representing sheath thrombi from the previously removed CVC. An intravenous heparin drip was initiated to prevent extension of the thrombus. After 20 days of therapy with Linezolid, 14 days with daptomycin, and 7 days with heparin, blood cultures were sterilized, with the last positive blood culture having been obtained 20 days after the first (Table 1, isolate 3). A repeat echocardiogram showed the innominate vein thrombi to be smaller.

Despite sterile blood cultures, the patient continued to have fevers and developed emesis. Eight days after the last positive blood culture, she developed acute mental status changes. When computed tomography of the head showed acute hydrocephalus, an external ventriculostomy drain (EVD) was emergently placed. Microscopic examination of cerebrospinal fluid (CSF) revealed Gram-positive cocci, and culture subsequently demonstrated growth of *E. faecium* (Table 1, isolate 4). When antimicrobial susceptibility testing revealed that the CSF isolate was resistant to Linezolid, this drug was discontinued. Other antibiotic options were limited. Because of the poor penetration of systemic daptomycin into the CSF,¹ the risks and benefits of direct intraventricular daptomycin therapy via ventriculostomy were discussed with the family, who agreed to proceed with this therapy.

On the basis of a previous report of intraventricular daptomycin use in an adult,² daptomycin 2.5 mg in 5 mL normal saline was administered via ventriculostomy tubing every 24 hours, locked for 30 minutes, and then reopened to continue CSF drainage. To reduce the risk of chemical meningitis due to direct instillation of the antimicrobial, we initiated intravenous dexamethasone, 1 mg every 6 hours for 5 days, on day 2 of intraventricular daptomycin. No clinical signs of increased central nervous system irritation (such as increased emesis or irritability) were observed, nor were increases in CSF pleocytosis or protein noted on daily monitoring. Peak and trough concentrations of daptomycin measured in CSF specimens from the EVD at the end of the intraventricular infusion and 30 minutes before the next dose were 24.44 and 2.97 mg/L, respectively. The measurements were obtained at the Center for Anti-Infective Research and Development (Hartford, CT), using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Supplemental Digital Content

Table 1. Baseline Clinical and Biological Variables from Mother-infant Pairs Included in the Study.

Characteristic	6w ZDV (n=138)	4w ZDV (n=33)	p
Mother's age, years (mean \pm SD)	31 \pm 4.8	34 \pm 6.6	.02
Caucasian race (%)	80	82	NS
Sexually-transmitted HIV infection (%)	63	64	NS
HCV co-infection (%)	38	30	NS
Mother's CDC clinical stage A (%)	76	79	NS
Antepartum CD4 cell count /mm ³ (mean \pm SD)	589 \pm 331	596 \pm 240	NS
Antepartum undetectable RNA-HIV (%)	73	85	NS
Substance abuse (%)	39	33	NS
Maternal ARV treatment			
Duration in weeks (mean \pm SD)	29.2 \pm 11.6	27.3 \pm 11.7	NS
HAART (%)	92	97	NS
Elective cesarean section (%)	73	79	NS
Intrapartum ZDV treatment (%)	99	91	NS
Male gender (%)	51	61	NS
Gestational age at birth (weeks; mean \pm SD)	37.4 \pm 1.2	37.3 \pm 1.3	NS
Birth weight (grams; mean \pm SD)	2834 \pm 440	2683 \pm 460	NS

ZDV, zidovudine; SD, standard deviation; HCV, hepatitis C virus; NS, not significant; ARV, antiretroviral; HAART, highly active antiretroviral treatment

Resum de l'article 1:

Metodologia:

Es tracta d'un estudi prospectiu observacional monocèntric realitzat en la cohort de pacients ENI de l'Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona) des de gener de 2000 a juny de 2008.

S'exclouen els pacients infectats pel VIH o VHC, els prematurs de < 36 setmanes de gestació i els afectes de patologies que puguin generar alteració dels paràmetres hematològics. S'inclouen en l'estudi aquells pacients exposats a ARV durant la gestació i que reben monoprofilaxi amb ZDV durant les primeres setmanes de vida.

En funció de la durada de la profilaxi neonatal, que varia amb l'evolució de les recomanacions de la prevenció vertical del VIH en cada moment, es classifiquen els pacients inclosos en dos grups: ZDV 6 setmanes vs ZDV 4 setmanes.

S'obtenen dades hematològiques a partir de les analítiques realitzades de rutina en el seguiment d'aquests pacients, a les 2-3 setmanes, 6 setmanes, 3, 6 i 12 mesos de vida, i es classifiquen segons la classificació de la Division of AIDS vigent en el moment de l'estudi (*DAIDS 2004*).

Resultats:

S'inclouen 171 pacients a l'estudi, prèvia exclusió de 50 pacients que no en compleixen criteris. D'aquests, 138 (80,7%) pacients reben 6 setmanes de ZDV oral al néixer, mentre que 33 (19,3%) en reben durant 4 setmanes.

Entre els dos grups s'observen diferències en l'edat materna (menor en el grup ZDV-6s) i en els fàrmacs ARV administrats durant la gestació (major ús de d4T, NFV i menor ús de FTC, ABC i TDF en el grup de ZDV-6s)

En resposta als objectius plantejats, els principals resultats a destacar són:

. No s'observen diferències en els nivells d'hemoglobina ni en els recomptes cel·lulars a les 2-3, 6 setmanes, 3, 6 i 12 mesos en comparar els pacients exposats 6 setmanes a ZDV amb els exposats 4 setmanes. Tampoc es detecten diferències en quant a la incidència de toxicitat hematològica establerta segons la graduació de la Division of AIDS.

. Els pacients exposats a 4 setmanes de ZDV presenten un menor volum corpuscular mig dels eritròcits a les 6 setmanes i als 3 mesos de vida ($p < 0.0001$ i $p = 0.02$ respectivament) en comparació als exposats 6 setmanes a ZDV. Aquestes diferències es mantenen després de realitzar l'anàlisi estadística multivariant.

. En la nostra cohort observem anèmia macrocítica lleu des del naixement i que s'autolimita als 3 mesos (veure gràfiques).

. En aquells pacients amb exposició prenatal a ZDV s'observa menor concentració d'hemoglobina (12,1 vs 13,1 g/dL; $p = 0,006$) i major incidència d'anèmia en qualsevol dels graus de la Division of AIDS (76% vs 48%; $p = 0,005$) a les 2-3 setmanes de vida.

ARTICLE 2

Influence of new antiretrovirals on hematological toxicity in HIV-exposed uninfected infants

Núria Rovira, Antoni Noguera-Julian, Susana Rives, Rubén Berrueco,
Rebeca Lahoz, Clàudia Fortuny.

European Journal of Pediatrics, en premsa

Influence of new antiretrovirals on hematological toxicity in HIV-exposed uninfected infants

Núria Rovira¹ · Antoni Noguera-Julian¹ · Susana Rives² · Rubén Berrueto² · Rebeca Lahoz³ · Clàudia Fortuny¹

Received: 16 December 2015 / Revised: 22 April 2016 / Accepted: 28 April 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Maternal combined antiretroviral therapy (cART) successfully prevents HIV mother-to-child transmission but also causes hematological toxicity in the HIV-exposed uninfected (HEU) infant. We performed a single-center prospective observational study. Hematological toxicity during the first year of life (at 3 and 6 weeks, and 3, 6, and 12 months) was compared between HEU infants born in two different time periods: P1 (2000–2001) and P2 (2007–2013). Mother-infant pairs in P1 ($n=55$) and P2 ($n=48$) mainly differed in maternal ethnic origin, HIV route of transmission, and cART regimens. Anemia and neutropenia were both less common in P2 than P1, albeit not significantly. Earlier normalization of red blood cell mean corpuscular volume levels in P2 infants suggests that current cART maternal regimens and shorter neonatal prophylaxis are less toxic. Leukocyte, lymphocyte, and platelet counts remained within normal values during follow-up, without differences between groups.

Conclusion: New cART regimens have had very little impact on the hematological toxicity in HEU infants.

What is Known:

- Antiretroviral drugs during pregnancy and the neonatal period very effectively prevent mother-to-child transmission of HIV infection.
- Hematological toxicity has been widely reported among HIV-exposed uninfected children.

What is New:

- In HIV-exposed uninfected children, hematological toxicity is still mainly caused by exposure to zidovudine.
- New antiretroviral drugs have very little impact on hematological toxicity among HIV-exposed uninfected children.

Keywords Anemia · Antiretrovirals · Hematological toxicity · HIV-exposed uninfected infant · Mother-to-child transmission

Abbreviations

ARV	Antiretroviral
cART	Combined antiretroviral treatment
DAIDS	Division of acquired immunodeficiency syndrome
HCV	Hepatitis C virus
HIV	Human immunodeficiency virus
MCV	Mean corpuscular volume
MTCT	Mother-to-child transmission
ZDV	Zidovudine

Introduction

Combined antiretroviral (ARV) therapy (cART) suppresses HIV replication in the HIV-infected pregnant woman and is

Communicated by David Nadal

Revisions received: 22 March 2016; 23 April 2016

✉ Clàudia Fortuny
cfortuny@hsjdbcn.org

¹ Infectious Diseases Unit, Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Passeig Sant Joan de Déu 2, 08950 Esplugues, Spain

² Pediatric Hematology and Oncology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

³ Pediatrics Department, Hospital Universitari Joan XXIII, Carrer Dr. Mallafre Guasch 4, 43005 Tarragona, Spain

critical to prevent HIV mother-to-child transmission (MTCT). In high-resource countries, HIV MTCT rates below 1 % have been consistently reported in the last decade. However, ARV-related short- and long-term toxicity in the HIV-exposed uninfected (HEU) infant remains of concern, with hematological toxicity being the most commonly observed [14]. In the last 15 years, new, more potent and less toxic ARV drugs and drug families have arisen and are being used for the treatment of HIV-infected individuals, including pregnant women [7]. We aimed to analyze whether these changes over time in cART regimens have had an impact on hematological toxicity in HEU infants.

Materials and methods

A single-center prospective observational study was conducted in a cohort of HEU infants, followed up in a tertiary care hospital in Barcelona (Spain). From January 2000 to December 2014, 320 mother-child pairs were included in the cohort, with the current HIV MTCT transmission rate being 1.88 % (95 % CI, 0.91–3.98). Informed consent was obtained from all mothers at enrollment, and the local ethics committee approved the study protocol.

In order to compare the influence of differing ARV exposures on hematological toxicity, HEU infants born in two different time periods were selected: from January 2000 to December 2001 (P1) and from January 2007 to December 2013 (P2). Exclusion criteria were MTCT HIV or HCV infection, gestational age at birth less than 36 weeks, children born to multiple gestations, severe neonatal illness, or major congenital malformations. In order to homogenize groups, infants whose mothers had not received cART during pregnancy and intravenous zidovudine (ZDV) at delivery, and those who had received neonatal prophylaxis other than ZDV monotherapy for at least 4 weeks, were excluded as well.

Demographic, clinical (including ARV exposure), and laboratory data of mother-infant pairs were collected. The latter were obtained from routine tests to exclude MTCT HIV infection, usually performed at 3 and 6 weeks, and 3, 6, and 12 months of age, and included hemoglobin (Hb; g/L), mean corpuscular volume (MCV; fL), leukocyte, neutrophil, lymphocyte cells ($10^9/\text{mm}^3$) and platelet counts ($10^9/\text{L}$). Full blood counts were performed locally with the same methods in both periods. Neutrophil counts and Hb levels were classified according to toxicity grades established by the Division of Acquired Immunodeficiency Syndrome (DAIDS), recently updated [12].

Statistical analysis Demographic and clinical data and hematological variables were compared between the two groups (P1 and P2). Statistical analysis was performed with SPSS Software version 17.0; chi-square test was used for

dichotomic variables, while Student's *t* test or Mann-Whitney *U* test was used for continuous ones, depending on variable distribution. A *p* value < 0.05 was considered significant. Binary or logistic regression was performed as appropriate.

Results

Overall, 55 (out of 96) and 48 (out of 104) HEU infants were eligible and included in P1 and P2, respectively. Maternal, gestational, delivery, and neonatal data are summarized in Table 1 and reflect differences in mothers' ethnicity, HIV transmission route, and HCV co-infection between the two periods, as well as changes over time in the availability of new ARV drugs and in HIV MTCT preventive strategies (including indication of elective caesarian section and duration of neonatal prophylaxis).

Hematological data from 43/28, 51/32, 48/34, 49/39, and 49/36 blood samples were available at 3 and 6 weeks, and at 3, 6 and 12 months of age in P1/P2, respectively. Attending to DAIDS toxicity grades, anemia and neutropenia were both less common in P2 as compared to P1, although these differences did not reach statistical significance (Fig. 1). In multivariate analysis (including maternal ethnicity, HIV transmission route and HCV co-infection, time period and gestational age at birth, use of caesarian section, and duration of neonatal prophylaxis with ZDV), mean \pm SD red blood cell MCV was significantly lower in period 2 compared to period 1 (at 3 months, 87 ± 5 vs 83 ± 5 fL in P2, $p = 0.001$) and in infants receiving the neonatal 4-week ZDV prophylaxis regime (at 6 weeks, 99 ± 6 vs 107 ± 6 fL in infants on the 6-week regime, $p < 0.001$). Maternal black ethnicity was associated with lower MCV values in the first months of life (103 ± 4 vs 119 ± 6 fL at birth, $p = 0.002$; 96 ± 7 vs 105 ± 6 fL at 6 weeks, $p = 0.001$; and 73 ± 7 vs 78 ± 4 fL at 6 months, $p = 0.025$), but not thereafter.

With regard to the rest of the cell lines (leukocyte, lymphocyte cells, and platelet counts), they remained within normal values during follow-up, and no differences were observed between P1 and P2. When exposure to ARV during gestation was taken into account, neither the type (individual drugs or regimens) nor the timing of exposure (to an individual drug or the accumulated exposure to different nucleoside analogs) was associated with differences in any of the hematological variables.

Discussion

Hematological toxicity was described early in HEU infants exposed to ZDV during the third trimester of pregnancy, delivery, and the neonatal period [3]. This mainly consists of macrocytic anemia, usually non-symptomatic and self-

Table 1 A comparison between period 1 and period 2 for main maternal, gestational, birth, and neonatal clinical and biological variables

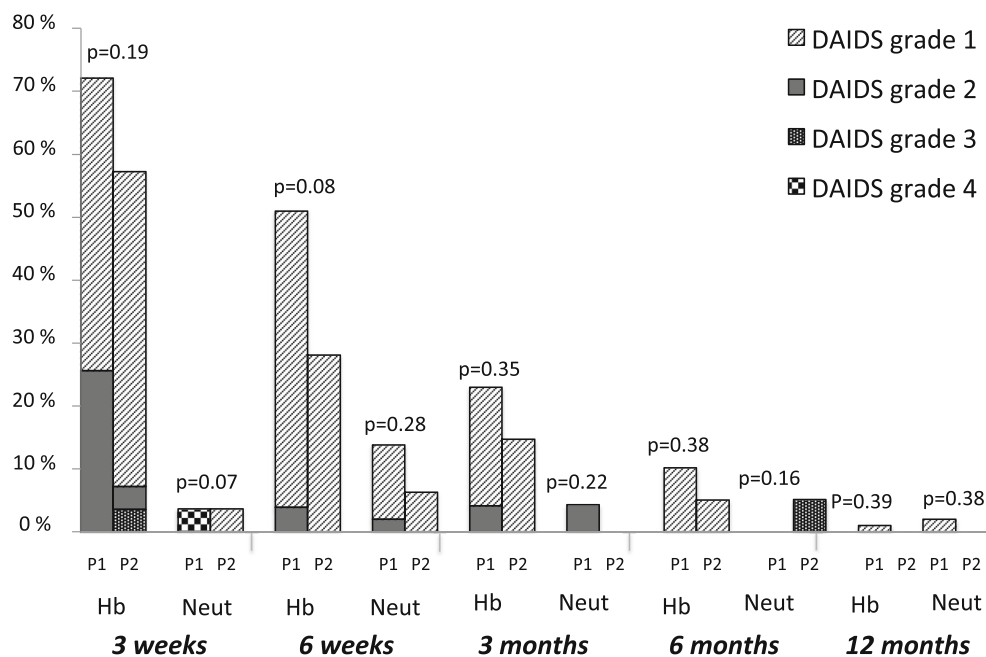
	Period 1 (n = 55)	Period 2 (n = 48)	<i>p</i>
Mother			
Age, in years (mean ± sd)	30.5 ± 4.6	31.8 ± 6.1	ns
Ethnic group, <i>n</i> (%)			
Caucasian	47 (85.5)	22 (46.8)	<0.0001
Black African	3 (5.5)	10 (21.3)	
Latin	2 (3.6)	8 (17)	
Recreational drug use, <i>n</i> (%)	24 (44.4)	19 (40.4)	ns
Parenteral HIV transmission, <i>n</i> (%)	21 (38.9)	2 (4.3)	<0.0001
AIDS, <i>n</i> (%)	5 (9.1)	6 (12.5)	ns
CD4 cell count at delivery, cells/mm ³ (mean ± sd)	566 ± 279	646 ± 277	ns
Undetectable HIV viral load at delivery, <i>n</i> (%)	47 (87.0)	46 (95.8)	ns
Hepatitis C virus co-infection, <i>n</i> (%)	24 (44.4)	6 (12.8)	<0.001
Maternal cART			
From the first trimester of pregnancy, <i>n</i> (%)	38 (69.1)	31 (64.6)	ns
Weeks on cART (mean ± sd)	30.8 ± 9.9	30.7 ± 11.0	ns
Protease-inhibitor-based cART, <i>n</i> (%)	34 (61.8)	30 (62.5)	ns
Nucleoside/nucleotide analogs, <i>n</i> (%)			
Zidovudine	35 (63.6)	35 (72.9)	ns
Lamivudine	49 (89.1)	40 (83.3)	ns
Stavudine	26 (47.3)	4 (8.3)	<0.0001
Didanosine	8 (14.5)	1 (2.1)	0.035
Emtricitabine	0	12 (25.0)	<0.0001
Abacavir	0	6 (12.5)	0.009
Tenofovir	0	11 (22.9)	<0.0001
Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, <i>n</i> (%)			
Nevirapine	25 (45.5)	16 (33.3)	ns
Efavirenz	1 (1.8)	2 (4.2)	ns
Protease inhibitors, <i>n</i> (%)			
Nelfinavir	28 (50.9)	4 (8.3)	<0.0001
Saquinavir	2 (3.6)	3 (6.3)	ns
Lopinavir/ritonavir	4 (7.3)	21 (43.8)	<0.0001
Indinavir	7 (12.7)	0	0.014
Atazanavir/ritonavir	0	1 (2.1)	ns
Fos-amprenavir/ritonavir	0	2 (4.2)	ns
Delivery and newborn			
Elective caesarian section, <i>n</i> (%)	55 (100)	31 (64.6)	<0.0001
Gestational age at birth, in weeks (median [range])	37 [36–40]	38 [36–40]	<0.0001
Birth weight, in grams (mean ± sd)	2910 ± 416	2946 ± 498	ns
Female gender, <i>n</i> (%)	31 (56.4)	25 (52.1)	ns
Apgar <8 at 1 and/or 5 min of life, <i>n</i> (%)	1 (1.8)	4 (8.7)	ns
Duration of zidovudine prophylaxis, <i>n</i> (%)			
6 weeks	55 (100)	8 (16.7)	<0.0001
4 weeks	0 (0)	40 (83.3)	

ns not significant, cART combined antiretroviral therapy

limited by the age of 3 months. Exposure to maternal or neonatal combined ARV therapy increases the severity of anemia, seldom requiring discontinuation of prophylaxis or

therapeutic interventions [5]. Small decreases in other cell lines (platelet, lymphocyte, CD4 and CD8 cell, and neutrophil counts) have also been described; unlike Hb levels, these

Fig. 1 Bar chart showing prevalence rates (in percentages) and evolution of hemoglobin (Hb) levels and neutropenia (Neut) in HIV-exposed uninfected infants from period 1 (P1, from January 2000 to December 2001) and period 2 (P2, from January 2007 to December 2013) according to toxicity grades established by the Division of Acquired Immunodeficiency Syndrome [12]



decreases may persist through age 18 to 24 months, or even longer in the case of neutrophil and lymphocyte counts [2, 10]. These findings have shown very little clinical relevance to date and the timing and need of hematologic monitoring in non-symptomatic HEU infants are uncertain; most experts recommend to remeasure hemoglobin levels and neutrophil counts when diagnostic HIV tests are obtained [7]. An increased incidence of encapsulated bacteria infections in the first year of life in HEU infants has been described in industrialized countries, but it is thought to be due to an altered mother-to-child IgG transfer through the placenta that leads to weakened humoral immunity [16]. Actually, it has been demonstrated that the production of specific antibodies after immunization in HEU infants is optimal [8].

In our study, according to the recently updated version of DAIDS toxicity grades [12], with notably higher thresholds for anemia and neutropenia, the prevalence rates observed for anemia and neutropenia were lower than those previously described by other authors (25.8–53.8 % for DAIDS grade ≥ 2 anemia and 14.6–48.0 % for neutropenia), although Hb and neutrophil absolute values were very similar [1, 8]. Three patients presented with clinically significant low hemoglobin levels or neutrophil counts (either DAIDS toxicity grade 3 or 4), but they remained asymptomatic and hematologic variables normalized spontaneously in all cases.

The small sample size, the lack of hematological data at birth, the absence of a control group of HEU ARV-unexposed infants for ethical reasons, and the observational nature of the study are obvious limitations. However, we used stringent inclusion criteria to optimally balance P1 and P2 groups. As expected, women in P2 were more commonly of immigrant origin and infected through sexual contact, neatly reflecting

current epidemiologic trends in Spain, where over half of new HIV diagnoses among women are in sexually infected immigrants [17]; consequently, HCV co-infection was also less common in P2.

Besides differences in epidemiological variables, mother-infants pair characteristics were very similar for the two periods, and major differences were only observed in maternal cART regimens and duration of neonatal prophylaxis with oral ZDV. More toxic nucleoside analogs were commonly used in P1 (didanosine, stavudine) as compared to P2 (abacavir, tenofovir). In spite of this, we did not observe significant differences between the two periods in any of the hematological variables that were collected, but there were differences in MCV values. Of note, ZDV was widely used in both periods (64 and 73 % of the women in P1 and P2, respectively) and this may explain the absence of differences. The *in vitro* inhibitory effect of ZDV on hematopoietic progenitors was reported early on by Dainiak and colleagues, and it is more severe in the fetal and neonatal erythroid lineages [4]. Several mechanisms have been hypothesized for this toxicity, such as mitochondrial DNA depletion [11], deficient mitochondrial production of heme group [13], disruption in globin synthesis [1], and a decrease in erythropoietin receptor expression [6].

Recent studies have blamed exposure to maternal cART as the main cause of anemia in HEU infants [5]. We observed an earlier normalization of MCV values in infants in P2 as compared to P1; although these findings were not clinically relevant, they do suggest that current cART regimens are less toxic than earlier ones, for the HEU infant as well. The duration of the neonatal ZDV prophylactic regimen, shortened from 6 to 4 weeks some years ago, partially explained this

earlier recovery of the erythroid cell lineage in the bone marrow in HEU infants, as we had previously reported [9]. Surprisingly, children born to Black African mothers also showed lower MCV values, albeit still macrocytic, that spontaneously normalized by the age of 12 months. Undiagnosed maternal ferropenia leading to neonatal microcytosis that would recover upon exclusive formula feeding may explain these findings [15]. Unfortunately, maternal hematological data were not available.

In conclusion, the availability of new ARV drugs for the treatment of HIV-infected pregnant women and the prevention of HIV MTCT has had very little impact on the hematological toxicity in HEU infants, which is mainly caused by exposure to ZDV-containing cART regimens during gestation.

Authors' contribution Núria Rovira, Antoni Noguera-Julian, Claudia Fortuny, and Rebeca Lahoz designed the study, collected and analyzed data, debated about conclusions, and wrote the paper. Susana Rives and Ruben Berruero analyzed and discussed hematological data and reviewed the manuscript.

Compliance with ethical standards

Funding This study was funded by Fundación para la Investigación y Prevención del SIDA en España, award number 240813/09.

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- Bridges EG, Trentesaux C, Lahlil R, Spiga MG, Jeannesson P, Sommadossi JP (1996) 3'-Azido-3'-deoxythymidine inhibits erythroid-specific transcription factors in human erythroid K562 leukemia cells. *Eur J Haematol* 56:62–67
- Bunders MJ, Bekker V, Scherpbier J, Boer K, Godfried M, Kuijpers TW (2005) Haematological parameters of HIV-1-uninfected infants born to HIV-1-infected mothers. *Acta Paediatr* 94:1571–1577
- Connor E, Sperling R, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan M, VanDyke R, Bey M, Shearer W, Jacobson R et al (1994) Reduction of maternal infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *N Engl J Med* 331:1173–1180
- Dainiak N, Worthington M, Riordan MA, Kreczko S, Goldman L (1988) 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) inhibits proliferation in vitro of human haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol* 69:299–304
- Dryden-Peterson S, Shapiro RL, Hughes MD, Powis K, Ogbu A, Moffat C, Moyo S, Makhema J, Essex M, Lockman S (2011) Increased risk of severe infant anemia after exposure to maternal HAART, Botswana. *J Acquir Immune Defic Syndr* 56:428–436
- Gogu SR, Malter JS, Agrawal KC (1992) Zidovudine-induced blockade of the expression and function of the erythropoietin receptor. *Biochem Pharmacol* 44:1009–1012
- Grupo de expertos de la Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida (SPNS), Grupo de Estudio de Sida (GeSIDA)/Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) y Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP) (2013) Documento de consenso para el seguimiento de la infección por el VIH en relación con la reproducción, embarazo, parto y profilaxis de la transmisión vertical del niño expuesto. Available at: <http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/publicaciones/profSanitarios/DocEmbarazoMarzo2013.pdf>. Accessed 3 Dec 2015
- Jones CE, Naidoo S, De Beer C, Esser M, Kampmann B, Hesseling AC (2011) Maternal HIV infection and antibody responses against vaccine-preventable diseases in uninfected infants. *J Am Med Assoc* 305:576–584
- Lahoz R, Noguera A, Rovira N, Català A, Sánchez E, Jimenez R, Fortuny C (2010) Antiretroviral-related hematologic short-term toxicity in healthy infants. Implications of the new neonatal 4-week zidovudine regimen. *Pediatr Infect Dis J* 29:376–379
- Le Chenadec J, Mayaux MJ, Guihenneuc-Jouyau C, Blanche S, Enquête Périnatale Française Study Group (2003) Perinatal antiretroviral treatment and hematopoiesis in HIV-uninfected infants. *AIDS* 17:2053–2061
- Lewis LD, Amin S, Civin CI, Letman PS (2004) Ex vivo zidovudine (AZT) treatment of CD34+ bone marrow progenitors causes decreased steady state mitochondrial DNA (mtDNA) and increased lactate production. *Hum Exp Toxicol* 23:173–185
- National Institute for Allergy and Infectious Disease (NIAID), Division of AIDS. Table for grading the severity of adult and pediatric adverse events, version 2.0 (2014). Available at: http://rsc.tech-res.com/Document/safetyandpharmacovigilance/DAIDS_AE_Grading_Table_v2_NOV2014.pdf. Accessed 3 Dec 2015
- Pollack S, Weaver J (1993) Azidothymidine (AZT)-induced siderosis. *Am J Hematol* 43:230–233
- Sollay S, Noguera Julian A, Galli L, Fortuny C, Deyà A, de Martino M, Chiappini E (2015) Strategies for the prevention of mother to child transmission in western countries. *Pediatr Infect Dis J* 34: S14–S30
- Stevens GA, Finucane MM, De-Regil LM, Paciorek CJ, Flaxman SR, Branca F, Peña-Rosas JP, Bhutta ZA, Ezzati M, Nutrition Impact Model Study Group (Anaemia) (2013) Global, regional, and national trends in haemoglobin concentration and prevalence of total and severe anaemia in children and pregnant and non-pregnant women for 1995–2011: a systematic analysis of population-representative data. *Lancet Glob Health* 1:e16–e25
- Taron-Brocard C, Le Chenadec J, Faye A, Dollfus C, Goetghebuer T, Gajdos V, Labaume JM, Perilhou A, Mandelbrot L, Blanche J et al (2014) Increased risk of serious bacterial infections due to maternal immunosuppression in HIV-exposed uninfected infants in a European country. *Clin Infect Dis* 59:1332–1345
- Vigilancia Epidemiológica del VIH/SIDA en España. Actualización 30 de Junio de 2014. Instituto de Salud Carlos III, Gobierno de España. Available at: http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/InformeVIHSida_Junio2014.pdf. Accessed 3 Dec 2015

Resum de l'article 2

Metodologia:

Estudi monocèntric, observacional i prospectiu realitzat en la cohort de lactants ENI seguits de forma ambulatoria a la Unitat de Malalties Infeccioses de l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona.

Són seleccionats aquells pacients no infectats pel VIH, fills de mare tractada amb TAR durant la gestació i ZDV endovenosa durant el part, i que reben monoteràpia amb ZDV durant el període neonatal. S'exclouen els bessons, els prematurs i els afectes de patologia greu.

Els pacients inclosos es classifiquen en dos grups en funció de l'any de naixement: de gener de l'any 2000 a desembre del 2001 (P1) i de gener del 2007 a desembre del 2013 (P2).

Es recullen dades epidemiològiques, clíniques i d'exposició a fàrmacs ARV; així com les variables hematològiques següents: Hb, en g/L; VCM, en fL; recompte de leucòcits, neutròfils i limfòcits, $10^9/\text{mm}^3$ i de plaquetes, $10^9/\text{L}$, al néixer, a les 3 i 6 setmanes i als 3, 6 i 12 mesos de vida. L'Hb i el recompte de neutròfils es classifiquen segons els graus de toxicitat de la Division of AIDS vigents (*DAIDS 2014*). Totes aquestes dades són comparades en funció de l'any de naixement (P1 i P2).

Resultats:

S'inclouen un total de 55 pacients en el P1 i 48 en el P2.

En comparar les característiques epidemiològiques i clíniques observem que les mares en el P2, amb més freqüència, són de raça negra (21,3% vs 5,5% en P1; $p < 0,0001$), s'infecten menys per ús de drogues per via parenteral (4,3% vs 38,9% en P1; $p < 0,0001$), i estan menys co-infectades per VHC (12,8% vs 44,4% en P1; $p < 0,0001$). A banda, en el P1 s'utilitzen amb més freqüència d4T, ddI, NFV i IDV durant l'embaràs, en contraposició al P2, en què s'utilitzen FTC, ABC, TDF i LPV/r. Els naixements per cesària disminueixen del 100% a P1 al 64,6% al P2 ($p < 0,0001$) i l'edat gestacional mediana al néixer varia de 37 setmanes a 38 setmanes de P1 a P2 ($p < 0,0001$). Finalment, la durada de la profilaxi

neonatal amb ZDV oral és de 6 setmanes en tots els pacients al P1, i només en el 16,7% dels lactants ENI en el P2 ($p < 0,0001$).

Pel que fa als paràmetres hematològics, es descriuen les següents troballes:

- No hi ha diferències significatives en quant a la incidència d'anèmia ni de neutropènia segons els graus de toxicitat de la Division of AIDS entre el P1 i el P2.
- Als 3 mesos de vida, els pacients del P1 presenten VCM més grans (87 ± 5 vs 83 ± 5 fL al P2, $p = 0.001$).
- A les 6 setmanes de vida, els pacients que reben profilaxi post-natal amb ZDV durant 6 setmanes presenten VCM més grans (107 ± 6 fL vs 99 ± 6 fL en els pacients que reben ZDV durant 4 setmanes; $p < 0,001$).
- Els fills de mare de raça negra presenten menor VCM al néixer, a les 6 setmanes i als 6 mesos de vida (103 ± 4 vs 119 ± 6 fL, $p = 0.002$; 96 ± 7 vs 105 ± 6 fL, $p = 0.001$; i 73 ± 7 vs 78 ± 4 fL, $p = 0.025$, respectivament), però no posteriorment.
- No s'observen altres diferències en la resta de línies cel·lulars entre el P1 i el P2, tampoc al tenir en compte els tipus ni la durada dels TAR administrats durant la gestació.

ARTICLE 3

Mitochondrial disturbances in HIV pregnancies

Constanza Morén, Antoni Noguera-Julian, Glòria Garrabou, Núria Rovira, Marc Catalán, Maria Bañó, Mariona Guitart-Mampel, Ester Tobías, Sandra Hernández, Francesc Cardellach, Òscar Miró, Clàudia Fortuny

AIDS 2015, Volum 29:5-12

Mitochondrial disturbances in HIV pregnancies

Constanza Morén^a, Antoni Noguera-Julián^b, Glòria Garrabou^a,
Núria Rovira^b, Marc Catalán^a, Maria Bañó^a, Mariona Guitart-Mampel^a,
Ester Tobías^a, Sandra Hernández^a, Francesc Cardellach^a,
Òscar Miró^a and Clàudia Fortuny^b

Background: Mitochondrial consequences from foetal exposure to HIV infection and antiretrovirals could be further investigated.

Objective: The main objective of this study was to evaluate maternofoetal mitochondrial disturbances in HIV infection and antiretroviral administration in human pregnancies as the aetiopathogenic basis of suboptimal perinatal-clinical features.

Design: Cross-sectional, prospective, observational, exploratory and controlled study.

Methods: Clinical/epidemiological data of 35 HIV-infected pregnant women and 17 controls were collected. Mitochondrial DNA (mtDNA) and RNA (mtRNA) content (real time-PCR), enzymatic activities and content (spectrophotometry) were measured in leucocytes. Genetic-functional, maternofoetal and molecular-clinical correlations were assessed.

Results: Birth weight was lower in infants from HIV-infected mothers compared with controls. MtDNA values were slightly decreased in HIV cases, although not reaching statistical significance. MtRNA values were lower in HIV-infected mothers. Similarly, binary complex II+III enzymatic activity decreased to 50% in both HIV-infected mothers ($44.45 \pm 3.77\%$) and their infants ($48.79 \pm 3.41\%$) ($P=0.001$ and $P<0.001$). Global CI+III+IV enzymatic activity was lower in HIV-infected mothers and infants ($90.43 \pm 2.39\%$ and $51.16 \pm 9.30\%$) ($P<0.005$ and $P<0.05$). MtDNA content correlated with function in mothers and infants. Maternofoetal parameters correlated at genetic and functional levels.

Conclusion: HAART toxicity caused mitochondrial damage in HIV-infected pregnant women and their newborns, being present at a genetic and functional level with a maternofoetal correlation. © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2015, **29**:5–12

Keywords: antiretrovirals, HAART, HIV infection, HIV pregnancies, in-utero exposure, mitochondrial dysfunction and perinatal outcomes

Introduction

The current implementation of recommendations for universal prenatal HIV counselling and testing, the gestational use of antiretroviral therapy (HAART),

scheduled caesarean section delivery and avoidance of breastfeeding, has led to a reduction in HIV mother-to-child transmission (MTCT) rates from around 20–25% to 1–2% in developed countries [1,2]. Widespread use of antiretroviral drugs has been accepted for the prevention

^aMuscle Research and Mitochondrial Function Laboratory, Cellex-IDIBAPS, Faculty of Medicine-University of Barcelona, Internal Medicine Department, Hospital Clínic of Barcelona, HCB, Barcelona, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, CIBERER, Valencia, and ^bInfectious Diseases Unit, Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

Correspondence to Dr Glòria Garrabou, Muscle Research and Mitochondrial Function Laboratory, Cellex-IDIBAPS, Faculty of Medicine-University of Barcelona, Internal Medicine Department, Hospital Clínic of Barcelona, HCB, Barcelona, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, CIBERER, Valencia Spain.

Tel: +34 93 227 5400x2907; fax: +34 93 227 93 65; e-mail: garrabou@clinic.ub.es.

Received: 9 December 2013; revised: 4 September 2014; accepted: 9 September 2014.

DOI:10.1097/QAD.0000000000000486

of MTCT despite the lack of data related to safety in human pregnancies [3,4]. The potential clinical risks associated with antiretroviral exposure in HIV-infected pregnant women and foetuses have been described by controversial observational studies [5–8] and potential mitochondrial implication has seldom been taken into account. There are limited data on possible toxicities in this population, and the large number of confounding factors limits any conclusions [9]. Antiretrovirals have been associated with adverse pregnancy outcomes such as preeclampsia, foetal death, preterm birth and low birth weight [10]. There are some studies reporting these negative effects of in-utero antiretroviral exposure in animal models [11].

Although antiretroviral therapy is required to suppress viral replication, leading to a decrease in MTCT rates and avoidance of disease progression, its derived mitochondrial toxicity has been widely described in adults, especially concerning the use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), which are known to inhibit mitochondrial DNA (mtDNA) polymerase γ [12] and may therefore lead to mitochondrial dysfunction [13]. Other antiretroviral groups included in the backbone of therapeutic regimens such as protease inhibitors and non-NRTI are also known to cause mitochondrial deficiencies mainly through the development of apoptosis [14]. Subclinical mitochondrial molecular consequences from in-utero exposure of foetuses to HIV infection and antiretroviral drugs have not been completely elucidated as well as their association with the perinatal clinical outcomes in human pregnancies. Mitochondrial alterations may entail many important and heterogeneous secondary adverse events such as neuropathies, lactic acidosis, hyperlactataemia, lipodystrophy or myopathies, common to primary mitochondrial disease [15], but they have also been suggested to play a role in fertility [16] and foetal development [10]. Recently, adverse neurochemical and behavioural effects derived from transplacental exposure to zidovudine have been described in a mouse model together with a potential protector role of L-acetylcarnitine on mitochondrial function [17].

The mitochondrial genome encodes for proteins of the mitochondrial respiratory chain. The relationship between mitochondrial genetic and functional parameters has already been demonstrated, both in antiretroviral-exposed animals and newborn [18]. Our group carried out a previous study to investigate the role of in-utero antiretroviral exposure in mitochondrial function in mononuclear cells isolated from chord blood from the newborn [10]. In the present study, mitochondrial parameters were measured directly from peripheral blood mononuclear cells of the infant for two purposes: to further confirm our previous results from chord blood, comparing the findings from chord blood with those of peripheral blood and to further investigate the transcriptional level and the general assessment of the global

mitochondrial respiratory chain, as these parameters were not considered in our last work [10].

Our previous findings showed a decrease in global mitochondrial function of the complete respiratory chain in a perinatally HIV-infected paediatric population [19] leading to analysis of this combined general mitochondrial enzymatic activity in infants exposed to antiretroviral drugs during gestation in the present study.

We hypothesized that antiretroviral-derived mitochondrial toxicity is present in HIV-infected and treated mothers and their foetuses exposed *in utero*, that the type and severity of the maternal involvement may be similarly reflected in the newborns and that this mitochondrial damage may underlie the clinical perinatal outcomes in HIV-infected human pregnancies.

The main objective of the present study was to evaluate the subclinical mitochondrial implication within the context of HIV infection and antiretroviral exposure in human pregnancies. We therefore aimed to (i) assess mitochondrial parameters in HIV-infected pregnant women and their infants exposed to antiretroviral *in utero*, (ii) correlate the genetic and functional levels of mitochondrial parameters and (iii) correlate the mother-foetal relationship of the mitochondrial parameters.

Methods

Design

We performed a single-site, cross-sectional, prospective, case-controlled observational and exploratory study with an inclusion period from 2007 to 2012.

Patients

Fifty-two mother–infant couples were recruited in this study. Thirty-five were classified as HIV-infected mothers (with their noninfected infants) and the control group included 17 HIV-uninfected mother–child pairs in follow-up because of other infections susceptible to be vertically transmitted, such as hepatitis C or B virus, syphilis or Chagas. All cases and controls were consecutively included during their routine prenatal care at the last trimester of gestation in the tertiary care Hospital St Joan de Déu of Barcelona (Barcelona, Spain), while the experimental procedures were performed in the Faculty of Medicine, Hospital Clínic of Barcelona (Barcelona, Spain).

Sample collection and processing

Twenty millilitres of peripheral blood were collected from the mothers in EDTA-tubes, with 2–5 ml being collected from their infants at the age of 6 weeks. Peripheral blood mononuclear cells were obtained by a Ficoll density gradient centrifugation procedure [20] divided into aliquots and stored at -80°C until analysis. Samples

from mother–child pairs in the control group were eligible only when maternal infection had definitely been ruled out in the infant, usually some months after collection.

Clinical analysis

Clinical data were collected through detailed questionnaires at inclusion and at delivery. Anthropometric data of the infant were also collected at delivery.

As per protocol, informed consent was obtained and epidemiological and obstetric parameters included information on maternal age, race, parity, and mode of delivery. Information regarding perinatal outcomes for both HIV-infected women and controls included the following data: preeclampsia (new onset of hypertension of >140 mmHg or >90 mmHg of SBP and DBP, respectively, and >300 mg proteins/24 h of urine), gestational age at delivery, preterm birth (<37 weeks of gestation), birth weight, infant small for gestational age (<10th percentile), 5-min Apgar score below 7, time and type of antiretroviral exposure, neonatal admission to ICU and global adverse perinatal outcome.

Molecular analysis of mitochondrial parameters

Protein content was measured according to the Bradford protein–dye binding-based method [21].

Total DNA was extracted by standard phenol–chloroform procedures. We analysed mtDNA content by the amplification of the mitochondrial gene mt12SrRNA and the nuclear constitutive gene nRNaseP using Applied Biosystems real-time quantitative PCR (Foster City, California, USA) in a 96-well plate and expressed in relative units as the ratio between mtDNA and nuclear DNA (mt12SrRNA/nRNaseP). The amplification procedure was performed as follows:

To determine mitochondrial mtDNA: MtF805 (5'-CCACGGGAAACAGCAGTGAT-3') was used as the 12SrRNA forward primer and MtR927 (5'-CTATTGACTTGGGTAAATCGTGTGA-3') was used as the 12SrRNA reverse primer, using a TaqMan sonda 6FAM-5'-TGCCAGCCACCGCG-3'-MGB, of Applied Biosystems.

To determine nuclear DNA a commercial kit was used (RNase P Control Reagent VIC, part no 4316844; Applied Biosystems).

The conditions for the amplification cycles for both genes were: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, 40 denaturalisation cycles of 15 s at 95°C and 60 s of annealing step at 60°C.

Total RNA was extracted by affinity microcolumns of Nucleospin (Düren, Germany), following the instructions of the commercial kit. Reverse transcription was

performed by using random hexamer primers before the RT-PCR experiment.

mtRNA was quantified amplifying a fragment of the conserved mitochondrial gene ND2 (using the forward 5'-GCCCTAGAAATAAACATGCTA-3' primer and the reverse 5'-GGGCTATTCCTAGTTTTATT-3' primer) and the constitutive nuclear gene 18SrRNA (using the forward primer 5'-ACGGACCAGAGCGAAAGCAT-3' and the reverse primer 5'-GGACATCTAAGGGCATCACAGAC-3' primer). Both genes were quantified separately by real-time quantitative PCR (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) and the results were finally expressed by the ratio between mtRNA and nuclear RNA (mtND2/n18SrRNA). The conditions for the amplification cycles were single denaturation–enzyme-activation step of 10 min at 95°C followed by 29 cycles (for the ND2 gene) and 35 cycles (for the 18SrRNA gene). Each cycle consisted in a denaturation step (0 s at 94°C for the ND2 gene and 2 s at 95°C for the 18SrRNA gene), an annealing step (10 s at 53°C for the ND2 gene and 10 s at 66°C for the 18SrRNA gene), and an extension step (10 s at 72°C for the ND2 gene and 20 s at 72°C for the 18SrRNA gene).

Mitochondrial function was measured spectrophotometrically according to the Rustin *et al.* [22] and Miró *et al.* [23] methodologies. We assessed the enzymatic activities of the isolated complexes: complex II (CII), complex IV (CIV) and binary combination enzymatic activities: complex II+III (CII+III), glycerol-3-phosphate dehydrogenase+complex III (G3PDH+CIII) and complete mitochondrial respiratory chain activity: complex I+III+IV (CI+III+IV) of the mitochondrial respiratory chain.

We measured mitochondrial content by citrate synthase activity (EC 4.1.3.7) with spectrophotometric measurements of the absorbance at 412 nm. Citrate synthase is a mitochondrial enzyme of the Krebs cycle which is widely considered as a reliable marker of mitochondrial content [22].

All the enzymatic activities were obtained as absolute values in nanomoles of synthesized product or consumed substrate per minute and milligram of protein (nmoles/min/mg protein) units and afterwards as relative values normalized by citrate synthase activity to relativize the enzymatic activity by mitochondrial content. The remaining genetic or transcriptional analyses were also normalized to citrate synthase activity to relativize parameters to mitochondrial mass.

Statistical analysis

Epidemiologic, clinical and mitochondrial data of HIV-infected women and their infants were compared with those of uninfected mother–child pairs to assess the

presence of obstetric/perinatal problems and mitochondrial damage due to in-utero exposure to HAART. Additionally, different correlations were sought between: (i) genetic and functional mitochondrial parameters (to ascertain dependence of mitochondrial function on mitochondrial genome content), (ii) mother-to-child mitochondrial parameters (to determine maternal influence on infant cellular condition) and (iii) clinical and experimental data (to assess mitochondrial implication in obstetric problems and perinatal outcomes).

Statistical analyses were performed by means of the SPSS 15.0 (Chicago, Illinois, USA) program using Mann–Whitney nonparametric tests to search for independent sample differences, chi-square tests were used to calculate odds ratio values (OR; 95% confidence interval [CI]; significance) and the Spearman's rank correlation coefficient was used to correlate parameters (R^2 and significance). Clinical parameters were expressed as mean \pm SD and experimental results were expressed as mean \pm SEM or percentages with respect to the means of controls, and the level of significance was set at 0.05 for all the statistical tests.

Results

Clinical data

The clinical and epidemiologic characteristics of the HIV-infected mothers and their infants and the control group have been summarized in Table 1.

The maternal, labour, neonatal prophylactic treatments are shown in Table 2. The incidence of preeclampsia in the HIV pregnancies was not higher compared with the controls. The incidence of preterm birth was higher in infants from HIV-infected mothers with respect to those from control pregnant women (36.36 vs. 21.42%), although this was not statistically significant. Additionally, the birth weight was significantly lower in HIV-exposed and antiretroviral-exposed newborn

compared with controls (2689.35 ± 615.92 vs. 3292.65 ± 540.45 , $P=0.001$).

Molecular data of mitochondrial parameters

The mitochondrial mass amount was not compromised in HIV-infected mothers or their infants as shown in Fig. 1. All the absolute mitochondrial parameters were relativized per mitochondrial mass by normalizing per citrate synthase enzymatic activity.

The mitochondrial genome (mtDNA) showed a trend towards depletion in both HIV-infected mothers and their infants with respect to controls (1.06 ± 0.21 and 0.97 ± 0.20 vs. 5.05 ± 2.58 and 2.05 ± 0.95 mtDNA 12SrRNA/nDNA RNaseP arbitrary ratio units, $P < 0.1$ for both). At the transcriptional level, mitochondrial RNA showed a decrease in HIV-infected mothers with respect to the control group (0.65 ± 0.16 vs. 5.50 ± 2.63 mtRNA ND2/nRNA 18SrRNA arbitrary ratio units, $P=NS$), attaining statistical significance in their infants (0.29 ± 0.46 vs. 4.78 ± 2.65 mtRNA ND2/nRNA 18SrRNA arbitrary ratio units, $P < 0.01$) (Fig. 2a and b).

Mitochondrial function, assessed in isolated complex II and complex IV enzymatic activities, was not compromised in HIV-infected mothers and their infants with respect to controls; CII: (0.22 ± 0.01 and 0.21 ± 0.01 vs. 0.25 ± 0.03 and 0.29 ± 0.04 nmole/min mg protein, $P=NS$ in all cases); CIV: (0.34 ± 0.029 and 0.34 ± 0.024 vs. 0.87 ± 0.24 and 0.39 ± 0.055 nmole/min mg protein, $P=NS$ in all cases). The isolated enzymatic activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) was not compromised in any case. G3PDH enzymatic activity combined to CIII was not significantly reduced in cases with respect to the controls. The measurement of binary enzymatic activity CII+CIII decreased to 50% both in HIV-infected mothers and their infants compared with controls (0.25 ± 0.01 vs. 0.45 ± 0.07 , $P=0.001$), (0.21 ± 0.01 vs. 0.41 ± 0.059 nmole/min mg protein, $P < 0.001$) (Fig. 2a and b).

Table 1. Clinical and epidemiologic characteristics of the HIV-infected mothers and their infants included in the study.

	Control mothers	Control infants	HIV-infected mothers	HIV-exposed infants
Sample size (<i>n</i>)	17	17	35	35
Age at blood draw (mean \pm SD)	34.3 years \pm 5.7	1.3 months \pm 0.7	31.4 years \pm 7.3	2.0 months \pm 0.7
Female gender (%)	100	58.82	100	41.93
Mean CD4 ⁺ lymphocyte count (cells/ μ l ³ \pm SD)	NA	NA	624.8 \pm 316.6	641.75 \pm 304.17
Mean viral load (Log10 viral load copies/ml \pm SD)	NA	NA	0.36 \pm 1.0	NA
Antiretroviral therapy				
3 NRTI (<i>n</i>)	NA	NA	2	0
2 NRTI + 1 or 2 PI, or 1NNRTI (<i>n</i>)	NA	NA	22	0
1 NRTI + 1 tNRTI or 1 PI (<i>n</i>)	NA	NA	5	1
ZDV monotherapy (<i>n</i>)	NA	NA	0	30
Obstetric parameters				
Preterm birth (%)	NA	21.4	NA	36.4
Birth weight (mean gr \pm SD)	NA	3292 \pm 540	NA	2689 \pm 615*

NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; PI, protease inhibitor; tNRTI, nucleotide reverse transcriptase inhibitor; ZDV, zidovudine. * $P=0.001$.

Table 2. Maternal, labour and neonatal prophylactic treatments.

Maternal pregnancy treatments	Maternal labour treatments	Neonatal treatments
Protease inhibitor-based regimens, <i>n</i> = 20	Intravenous ZDV, <i>n</i> = 32	ZDV monotherapy, <i>n</i> = 33
ZDV/3TC+LPV/r, <i>n</i> = 7	Untreated, <i>n</i> = 3	ZDV+NVP, <i>n</i> = 1
ZDV/3TC+SQV/r, <i>n</i> = 3		ZDV+3TC+NVP, <i>n</i> = 1
TDF/FTC+LPV/r, <i>n</i> = 2		
ZDV/3TC+FPV/r, <i>n</i> = 2		
ABC/3TC+LPV/r, <i>n</i> = 1		
ABC+TDF+LPV/r, <i>n</i> = 1		
3TC+d4T+LPV/r, <i>n</i> = 1		
ZDV/3TC+NFV, <i>n</i> = 1		
TDF/FTC+ATV/r, <i>n</i> = 1		
TDF/FTC+SQV/r, <i>n</i> = 1		
NNRTI-based regimens, <i>n</i> = 12		
ZDV/3TC+NVP, <i>n</i> = 6		
ZDV+FTC+EFV, <i>n</i> = 2		
ABC/3TC+NVP, <i>n</i> = 1		
ABC+ddl+NVP, <i>n</i> = 1		
ABC+FTC+NVP, <i>n</i> = 1		
ABC/3TC/ZDV, <i>n</i> = 1		
ZDV monotherapy, <i>n</i> = 1		
Untreated, <i>n</i> = 2		

1st trimester exposure to antiretrovirals, 21/33 mothers (63.6%), median (range) duration of antiretroviral treatment during pregnancy: 33.5 (4–40) weeks. 3TC, lamivudine; ABC, abacavir; ATV/r, atazanavir/ritonavir; d4T, stavudine; ddl, didanosine; EFV, efavirenz; FPV/r, fosamprenavir/ritonavir; FTC, emtricitabine; LPV/r, lopinavir/ritonavir; NFV, nelfinavir; NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors; NVP, nevirapine; SQV/r, saquinavir/ritonavir; TDF, tenofovir; ZDV, zidovudine.

General assessment of the whole mitochondrial respiratory chain enzymatic activity through analysis of CI+III+IV showed a significant decrease in both HIV-infected mothers and their infants compared with the control groups (0.20 ± 0.05 and 0.21 ± 0.03 vs. 2.09 ± 0.82 and 0.43 ± 0.11 ; $P < 0.01$ and $P = 0.05$) (Fig. 2a and b).

Mitochondrial genetic and functional associations

Mitochondrial genome content correlated with mitochondrial function measured as CII+CIII/citrate synthase enzymatic activity (Fig. 3a) in both groups of mother–child pairs, whether HIV-infected or not.

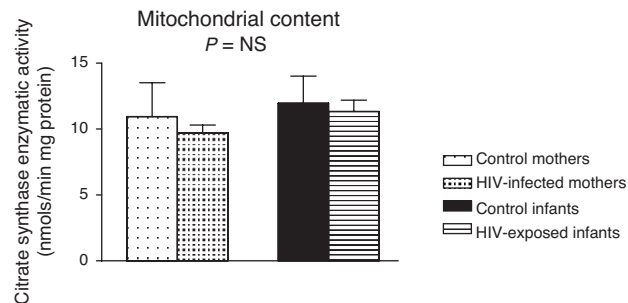


Fig. 1. Mitochondrial content measured by citrate synthase enzymatic activity of mothers and infants in both the control and case groups. Mann–Whitney nonparametric test.

Maternofoetal associations

The mitochondrial parameters of the mothers and their infants positively correlated at a genetic level, measured as mtDNA content, as well as at the functional level, with CII+CIII/citrate synthase measurement (Fig. 3b and c) in both cohorts. No consistent molecular and clinical associations were found in the present study (Fig. 3d and e).

Discussion

Although mitochondrial toxicity has been demonstrated in in-utero exposure to antiretroviral drugs in animal models, specifically secondary to NRTIs [24], more information on this subject in human HIV pregnancies could be addressed.

Previous studies have demonstrated HAART-induced mtDNA depletion in oocytes from HIV-infected women that may impair their reproductive capacity [16].

The present study does not show a higher incidence of preeclampsia in HIV pregnancies. There were no cases of foetal death in any of our cohorts. However, the incidence of preterm birth tended to be higher and birth weight was significantly lower in infants born to HIV-infected mothers with antiretroviral treatment. Previous studies have demonstrated the implication of mitochondria in abnormal perinatal foetal weight in non-HIV or HAART-exposed mothers [25]. The clinical data in our study suggest an association of HAART toxicity in the context of HIV infection and the presence of perinatal outcomes in human pregnancies. We therefore wished to determine whether the mitochondrion remains behind these clinical manifestations, as the aetiopathogenic basis.

As the viral load of the HIV-infected mothers was undetectable and the infants were confirmed to be HIV-negative, the mitochondrial toxicity observed in our HAART-exposed cohorts was attributed to antiretroviral exposure but not to HIV infection itself.

Mitochondrial amount was not affected in HIV-infected mothers and their in-utero antiretroviral-exposed newborns. However, the mitochondrial genome showed a trend towards depletion in both HIV-infected mothers and their infants with respect to controls. These findings are in accordance with previous studies reporting mtDNA depletion in newborn from HIV-infected and treated mothers [26–29]. The trend to mtDNA depletion observed in the present study was reflected downstream at the transcriptional and functional levels, displaying an organelle dysfunction with significantly lower mtRNA levels in HIV-exposed infants and a decrease in the combined binary and global enzymatic activities of the mitochondrial respiratory chain, respectively. Despite

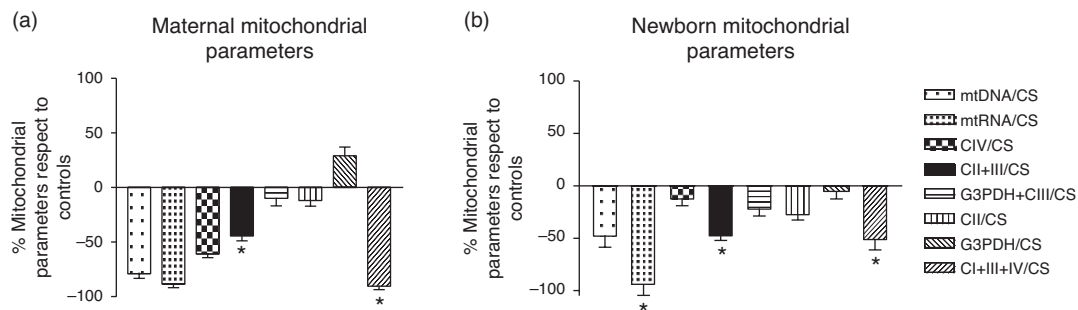


Fig. 2. (a) Maternal mitochondrial parameters and (b) Mitochondrial parameters of the infants. Percentage of increase/decrease of the mitochondrial parameters in HIV-infected mothers with respect to the mean values of uninfected controls. CIII, complex III; CII+III, complex II+III; CI+III+IV, complex I+III+IV; CIV, complex IV; G3PDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; MtDNA, mitochondrial DNA; mtRNA, mitochondrial RNA. * $P=0.05$. Mann-Whitney nonparametric test.

the general involvement of these global enzymatic activities, isolated complexes were not compromised. These findings are consistent with our previous studies in perinatally HIV-infected paediatric patients in which we found significant alterations of the global enzymatic activity of mitochondria in the absence of any suboptimal function of single complexes [19]. Our results suggest the presence of mild alterations in individual complexes of the mitochondrial respiratory chain which are only noticeable through the measurement of binary or global enzymatic activities, thus, reaching a detectable threshold as a summatory effect of these mild alterations.

The positive and significant correlation found between mitochondrial genetics and functional binary enzymatic

activity strengthens the idea of a genetic defect affecting the general function of the mitochondria and, subsequently, cell viability. This fact demonstrates the dependence of mitochondrial function on mitochondrial genetics.

The significant positive correlation between the mater-foetal mitochondrial parameters suggests that the toxicity caused by HAART in the context of HIV infection in human pregnancies has a similar impact on both the mother and fetus. Consequently, our findings show that the mtDNA depletion, the decrease in mtRNA content and the general dysfunction of the mitochondrial respiratory chain observed in HIV-infected mothers also occurred in their newborn.

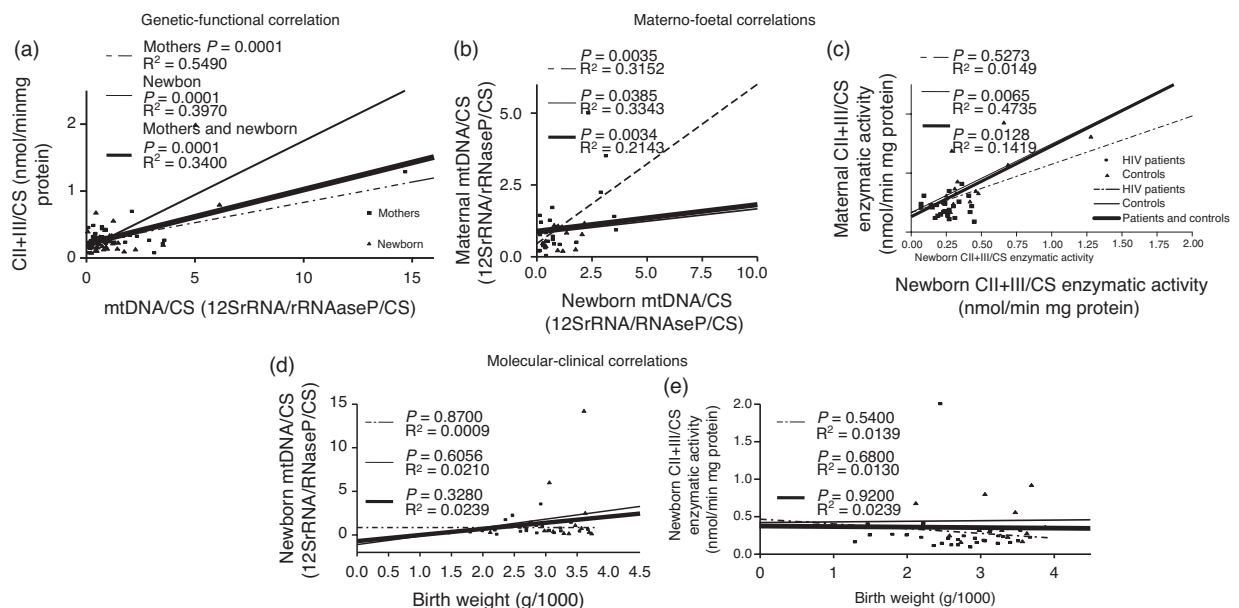


Fig. 3. Mitochondrial genetic-functional, maternofoetal and molecular-clinical correlations. (a) Mitochondrial genome and function in mothers and newborn; (b) Mitochondrial genome; (c) Mitochondrial function; (d) Mitochondrial genome and birth weight; (e) Mitochondrial function and birth weight. CII+III, complex II+III enzymatic activity; CS, citrate synthase; MtDNA, mitochondrial DNA.

As the use of chord blood may be questioned as a proper model of study due to a possible contamination with maternal cells, we assessed all the molecular parameters in samples from the peripheral blood (specifically monocytes and lymphocytes) of infants obtained at the age of 6 weeks to further confirm the results of our previous study performed in chord blood cells from mother–newborn couples [10]. The findings derived from the present work confirm the presence of a mitochondrial lesion following the same general pattern of maternofetal correlation.

Although abnormal perinatal outcomes and mitochondrial alterations were more prevalent in HIV-infected mothers and their infants with respect to uninfected controls, the results obtained from this study do not confirm an association between the mitochondrial defects and the clinical manifestations observed (preterm birth and low birth weight). Further studies in larger cohorts are necessary to confirm a potential relationship between antiretroviral exposure and clinical morbidities in HIV-infected mothers and newborn.

Finally, the presence of a mitochondrial lesion derived from antiretroviral intake both in HIV-infected pregnant women and in their newborns exposed *in utero* indicates that the toxic effects associated with HAART cross the placenta and affect the HIV-negative, but antiretroviral in-utero exposed newborn in a similar manner. As the antiretroviral intake ensures that viral loads are decreased to undetectable levels, it is expected that the damage in mitochondrial function in the HIV-infected mothers should be rather attributed to antiretroviral drugs. However, it is generally considered that the infant may sustain some mitochondrial dysfunction caused by the maternal virus infection, in the absence of any drug therapy, [28]. The HAART-derived toxicity in fertility or pregnancy context confirms previously documented results in chord blood cells from HIV-uninfected but HAART-exposed newborn [9].

Some limitations of this study are worthy to be mentioned. In spite of the previously mentioned fact that the mitochondrial toxicity in our cohort has been attributed to antiretroviral exposure rather than to HIV infection itself, it is not possible to completely dissect the role of mother's HIV infection and HAART because all HIV-infected-pregnant women are currently treated. Furthermore, the heterogeneity of therapeutic schedules and the clinical history of each patient, with differential cumulative antiretroviral drug intake, hampers the possibility of further specific descriptions of the molecular mechanisms together with more focalized antiretroviral-specific conclusions.

In summary, the findings of the present study demonstrate a significantly lower birth weight and genetic and functional maternofetal mitochondrial toxicity in HIV-infected mothers and their infants, although no

relationship was found among these clinical and molecular parameters.

Acknowledgements

The authors are indebted to Donna Pringle for the English correction. The authors are indebted to Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE) and CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER, an initiative of ISCIII).

Source of funding: This work was supported by Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España [grant numbers FIPSE 36612/06, FIPSE 360982/10, FIPSE 360745/09]; Fundació Cellex, *Fondo de Investigación Sanitaria* [grant numbers FIS 00462/11, FIS 01199/12, FIS PI13/01738]; *Suports a Grups de Recerca de la Generalitat de Catalunya* [grant number SGR 14/376] and CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER, an initiative of ISCIII).

Role of each of the authors in the study reported: C.M. is the main author of the manuscript as she was in charge of most of the experimental procedures; A.N.J. is the coordinator of the Infectious Disease Unit of the paediatric hospital Sant Joan de Déu. He organises the inclusion of the patients; G.G. is the postdoctoral research who coordinates the experimental research procedures; N.R. is the person in charge of the inclusion of the controls; M.C. is responsible for the enzymatic activities measurement; M.B. is responsible for the mitochondrial DNA content quantification; M.G.M. is responsible for the analysis of the total cell protein content; E.T. is the laboratory technician in charge of the preparation and cryopreservation of the samples; S.H. is the gynaecologist in charge of the management of the obstetric data; F.C. is the head of the Internal Medicine Department who is in charge of the final review of the study; O.M. is the clinician in charge of the management and analysis of the clinical data; C.F. is the head of the Infectious Disease Unit of the paediatric hospital who coordinates the inclusion of the samples and the management of the project.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

1. Giacomet V, Vigano A, Erba P, Nannini P, Pisanelli S, Zanchetta N, *et al.* **Unexpected vertical transmission of HIV infection.** *Eur J Pediatr* 2014; **173**:121–123.
2. Townsend CL, Cortina-Borja M, Peckham CS, de Ruiter A, Lyall H, Tookey PA. **Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000–2006.** *AIDS* 2008; **22**:973–981.

3. Sturt AS, Dokubo EK, Sint TT. **Antiretroviral therapy (ART) for treating HIV infection in ART-eligible pregnant women.** *Cochrane Database Syst Rev* 2010;CD008440.
4. Blanche S, Warszawski J. [Tolerance of antiretroviral drugs during pregnancy]. *Med Sci (Paris)* 2013; **29**:383–388.
5. Lambert JS, Watts DH, Mofenson L, Stiehler ER, Harris DR, Bethel J, et al. **Risk factors for preterm birth, low birth weight, and intrauterine growth retardation in infants born to HIV-infected pregnant women receiving zidovudine.** *Pediatric AIDS Clinical Trials Group 185 Team. AIDS* 2000; **14**:1389–1399.
6. Brocklehurst P, French R. **The association between maternal HIV infection and perinatal outcome: a systematic review of the literature and meta-analysis.** *Br J Obstet Gynaecol* 1998; **105**:836–848.
7. Tuomala RE, Shapiro DE, Mofenson LM, Bryson Y, Culnane M, Hughes MD, et al. **Antiretroviral therapy during pregnancy and the risk of an adverse outcome.** *N Engl J Med* 2002; **346**:1863–1870.
8. Tuomala RE, Watts DH, Li D, Vajaranant M, Pitt J, Hammill H, et al. **Improved obstetric outcomes and few maternal toxicities are associated with antiretroviral therapy, including highly active antiretroviral therapy during pregnancy.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; **38**:449–473.
9. Heidari S, Mofenson L, Cotton MF, Marlink R, Cahn P, Katabira E. **Antiretroviral drugs for preventing mother-to-child transmission of HIV: a review of potential effects on HIV-exposed but uninfected children.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; **57**:290–296.
10. Hernandez S, Moren C, Lopez M, Coll O, Cardellach F, Gratacos E, et al. **Perinatal outcomes, mitochondrial toxicity and apoptosis in HIV-treated pregnant women and in-utero-exposed newborn.** *AIDS* 2012; **26**:419–428.
11. Divi RL, Einem TL, Fletcher SL, Shockley ME, Kuo MM, St Claire MC, et al. **Progressive mitochondrial compromise in brains and livers of primates exposed in utero to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs).** *Toxicol Sci* 2010; **118**:191–201.
12. Koczor CA, Lewis W. **Nucleoside reverse transcriptase inhibitor toxicity and mitochondrial DNA.** *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010; **6**:1493–1504.
13. Lewis W, Dalakas MC. **Mitochondrial toxicity of antiviral drugs.** *Nat Med* 1995; **1**:417–422.
14. Apostolova N, Blas-Garcia A, Esplugues JV. **Mitochondrial toxicity in HAART: an overview of in vitro evidence.** *Curr Pharm Des* 2011; **17**:2130–2144.
15. Chaudhry N, Patidar Y, Puri V. **Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes unveiled by valproate.** *J Pediatr Neurosci* 2013; **8**:135–137.
16. Lopez S, Coll O, Durban M, Hernandez S, Vidal R, Suy A, et al. **Mitochondrial DNA depletion in oocytes of HIV-infected antiretroviral-treated infertile women.** *Antivir Ther* 2008; **13**:833–838.
17. Zuena AR, Giuli C, Venerosi Pesciolini A, Tramutola A, Ajmone-Cat MA, Cinque C, et al. **Transplacental exposure to AZT induces adverse neurochemical and behavioral effects in a mouse model: protection by L-acetylcarnitine.** *PLoS One* 2013; **8**:e55753.
18. Ross AC, Leong T, Avery A, Castillo-Duran M, Bonilla H, Lebrecht D, et al. **Effects of in utero antiretroviral exposure on mitochondrial DNA levels, mitochondrial function and oxidative stress.** *HIV Med* 2012; **13**:98–106.
19. Moren C, Noguera-Julian A, Rovira N, Corrales E, Garrabou G, Hernandez S, et al. **Mitochondrial impact of human immunodeficiency virus and antiretrovirals on infected pediatric patients with or without lipodystrophy.** *Pediatr Infect Dis J* 2011; **30**:992–995.
20. Prilutskii AS, Khodakovskii AV, Mailian EA. [A method of separating mononuclears on a density gradient]. *Lab Delo* 1990:20–23.
21. Bradford MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976; **72**:248–254.
22. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, et al. **Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies.** *Clin Chim Acta* 1994; **228**:35–51.
23. Miró O, Cardellach F, Barrientos A, Casademont J, Rotig A, Rustin P. **Cytochrome c oxidase assay in minute amounts of human skeletal muscle using single wavelength spectrophotometers.** *J Neurosci Methods* 1998; **80**:107–111.
24. Gerschenson M, Nguyen V, Ewings EL, Ceresa A, Shaw JA, St Claire MC, et al. **Mitochondrial toxicity in fetal Erythrocebus patas monkeys exposed transplacentally to zidovudine plus lamivudine.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; **20**:91–100.
25. Gemma C, Sookoian S, Alvarinas J, Garcia SI, Quintana L, Kanevsky D, et al. **Mitochondrial DNA depletion in small- and large-for-gestational-age newborns.** *Obesity (Silver Spring)* 2006; **14**:2193–2199.
26. Divi RL, Walker VE, Wade NA, Nagashima K, Seilkop SK, Adams ME, et al. **Mitochondrial damage and DNA depletion in cord blood and umbilical cord from infants exposed in utero to Combivir.** *AIDS* 2004; **18**:1013–1021.
27. Aldrovandi GM, Chu C, Shearer WT, Li D, Walter J, Thompson B, et al. **Antiretroviral exposure and lymphocyte mtDNA content among uninfected infants of HIV-1-infected women.** *Pediatrics* 2009; **124**:e1189–e1197.
28. Poirier MC, Divi RL, Al-Harthi L, Olivero OA, Nguyen V, Walker B, et al. **Long-term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; **33**:175–183.
29. Shiramizu B, Shikuma KM, Kamemoto L, Gerschenson M, Erdem G, Pinti M, et al. **Placenta and cord blood mitochondrial DNA toxicity in HIV-infected women receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitors during pregnancy.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; **32**:370–374.

Resum de l'article 3

Metodologia:

Estudi monocèntric, transversal i observacional, en el que s'inclouen parelles mare-fill casos i controls, en seguiment a les Consultes Externes de la Unitat de Malalties Infeccioses del Servei de Pediatria de l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona.

Els casos corresponen a parelles formades per la mare infectada pel VIH i el seu nadó ENI; els controls corresponen a parelles mare-fill VIH negatives en seguiment per risc de transmissió vertical d'altres malalties (VHB, VHC, sífilis o malaltia de Chagas), entre les que no s'inclou el VIH, i un cop descartada la infecció materna en el fill.

A les 6 setmanes de vida del nadó s'obtenen mostres de sang perifèrica tant de la mare com del nadó, de les que s'extreuen *pellets* de CMSP que es criopreserven fins al seu processament.

Es recullen dades clíniques (de la infecció materna, obstètriques i neonatals) de les parelles incloses.

En l'estudi de funció mitocondrial es determina:

- Activitat CS, mesurada per espectrofotometria, reflexe de la massa mitocondrial.
- ADNmt (ràtio entre els gens mt12SrRNA (mitocondrial) i nRNaseP (nuclear), corregida per massa mitocondrial).
- ARNmt (ràtio entre els gens mtND2 (mitocondrial) i n18SrRNA (nuclear), corregida per massa mitocondrial).
- Funció de la cadena respiratòria mitocondrial, mesurant activitats enzimàtiques dels complexos de forma aïllada (CII, CIV, G3PDH) o combinada (CII+CIII, G3PDH+CIII i CI+CIII+CIV). Expressat en nmols/min/mg de proteïna, corregit per massa mitocondrial.

Resultats:

S'inclouen 35 casos de parelles mare-fill i 17 parelles control.

Entre les parelles mare-fill amb infecció materna pel VIH, 33/35 mares (94%) van rebre TAR durant la gestació, i 33/35 nadons (94%) van rebre monopofilaxi amb zidovudina.

- Pel que fa a les dades clíniques:
 - S'observa menor pes al néixer en els nounats exposats al VIH en comparació amb els controls (2689 ± 616 vs 3293 ± 540 grams; $p=0,001$). No s'observen diferències en la resta de variables de la infecció materna, obstètriques ni neonatals.

- Dades de metabolisme mitocondrial:
 - No diferències en la massa mitocondrial entre casos i controls.
 - Les ràtios d'ADNmt i d'ARNmt són menors en mares infectades i els seus nadons respecte els controls. En l'ADNmt ni en l'ARNmt matern les diferències no són estadísticament significatives, ho són únicament en l'ARNmt dels nadons.
 - Funció enzimàtica de la CRM: no s'observen diferències en les activitats aïllades de CII, CIV ni G3PDH, ni en la combinació de CIII+G3PDH. En les mares infectades i els seus nadons s'observa una menor activitat de CII+CIII en comparació als controls, així com de l'activitat global de la CRM (CI+CIII+CIV).

	<i>Mares</i>			<i>Nadons</i>		
	VIH+	Controls	p	ENI	Controls	p
CS			<i>ns</i>			<i>ns</i>
ADNmt			<i>ns</i>			<i>ns</i>
ARNmt			<i>ns</i>	0,29±0,46	4,78±2,65	p<0,01
CII			<i>ns</i>			<i>ns</i>
CIV			<i>ns</i>			<i>ns</i>
G3PDH			<i>ns</i>			<i>ns</i>
CIII+G3PDH			<i>ns</i>			<i>ns</i>
CII+CIII	0,25±0,01	0,45±0,07	p=0,001	0,21±0,01	0,41±0,059	p<0,001
CI+CIII+CIV	0,20±0,05	2,09±0,82	p<0,01	0,21±0,03	0,43 ± 0,11	p=0,05

- Tant en les parelles mare-fill casos com en les parelles controls; i tant en mares com en nadons, s'observa una correlació positiva entre l'ADNmt i l'activitat enzimàtica de CII+CIII.

- També s'observa correlació positiva entre l'ADNmt matern i el del lactant ENI, així com en l'activitat de CII+CIII materna i neonatal.

- No s'observa cap correlació entre els paràmetres del metabolisme mitocondrial i les variables clíniques analitzades (de la infecció materna, obstètriques o neonatals).

ARTICLE 4

Decreased mitochondrial function among healthy infants exposed to antiretrovirals during gestation, delivery and the neonatal period.

Antoni Noguera-Julian, Constanza Morén, Núria Rovira, Glòria Garrabou, Marc Catalán, Emília Sánchez, Francesc Cardellach, Òscar Miró, Clàudia Fortuny

The Pediatric Infectious Disease Journal 2015, Volum 34 (12):1349-54

Decreased Mitochondrial Function Among Healthy Infants Exposed to Antiretrovirals During Gestation, Delivery and the Neonatal Period

Antoni Noguera-Julian, MD, PhD,* Constanza Morén, BS, PhD,†‡§ Núria Rovira, MD,*
Glòria Garrabou, BS, PhD,†‡§ Marc Catalán, BS,†‡§ Emília Sánchez, MD, PhD,¶
Francesc Cardellach, MD, PhD,†‡§ Óscar Miró, MD, PhD,†‡§ and Clàudia Fortuny, MD, PhD*

Background: Antiretroviral (ARV)-associated mitochondrial toxicity in HIV/ARV-exposed healthy infants is a concern. Clinically relevant toxicity is rare. Hyperlactatemia is common but nonspecific, both increased and decreased mitochondrial DNA (mtDNA) level has been reported. Mitochondrial function has scarcely been investigated.

Methods: In a prospective observational study of 133 HIV/ARV-exposed infants, mtDNA content was measured with quantitative real-time polymerase chain reaction, and mitochondrial respiratory chain enzymatic activity of complex IV (CIV) and mitochondrial mass (MM) were assessed spectrophotometrically from cryopreserved peripheral blood mononuclear cells obtained at 6 weeks and 3, 6 and 12 months of age and compared with a control group.

Results: Most mothers (88%) received combined ARV therapy during pregnancy, and 92% of infants received zidovudine monotherapy. No infant had clinical evidence of mitochondrial disease during follow-up. Nonsignificant higher MM and lower mtDNA levels (normalized by MM) were observed over time in HIV/ARV-exposed infants. MM-normalized CIV activity was consistently lower in HIV/ARV-exposed children than in controls over time (0.09 vs. 0.35, 0.12 vs. 0.38, 0.13 vs. 0.24 and 0.14 vs. 0.24 nmol/min/mg at 6 weeks and 3, 6 and 12 months; $P = 0.014$, $P < 0.0001$, $P = 0.065$ and $P = 0.011$, respectively) and showed a linear trend toward normalization with age ($P < 0.01$). In HIV/ARV-exposed infants, an inverse correlation between CIV activity and mtDNA levels was observed until 6 months of age ($r = -0.327$, $P = 0.016$; $r = -0.311$, $P = 0.040$ and $r = -0.275$, $P = 0.046$).

Conclusions: Mitochondrial-encoded CIV activity was consistently lower among HIV/ARV-exposed healthy infants and inversely correlated with mtDNA levels, suggesting upregulation of the latter.

Key Words: antiretrovirals, HIV-exposed healthy infants, mitochondrial DNA, mitochondrial function

(*Pediatr Infect Dis J* 2015;34:1349–1354)

The routine use of highly active antiretroviral (ARV) therapy (HAART) in HIV-infected pregnant women has led to a dramatic decrease in mother-to-child HIV transmission rates to below 1%–2%. Recommended HAART regimens during pregnancy include a dual nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) backbone together with a third drug, usually a protease inhibitor or a non-NRTI. HIV-exposed infants routinely receive zidovudine (ZDV) prophylaxis for the first 4–6 weeks of life.^{1–3} NRTIs are known to inhibit both HIV reverse transcriptase and human DNA- γ -polymerase, an endogenous enzyme dedicated to the replication and repair of the mitochondrial DNA (mtDNA) genome.^{4–6}

Several adverse effects have been attributed to NRTI-related mitochondrial toxicity in adult and pediatric HIV-infected patients chronically receiving these drugs.^{7–11} Genetic and biochemical findings consistent with mitochondrial injury have also been described in HIV/ARV-exposed healthy children in European and American cohorts, ultimately leading to infrequent clinical syndromes similar to those of inherited mitochondrial diseases.^{12–14} Smaller studies have reported hyperlactatemia rates ranging from 48% to 92%, with infants generally symptom free and showing a trend toward normalization during the first year of life.^{15,16}

With regard to mtDNA content in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs; lymphocytes and monocytes), some studies have shown mtDNA depletion in these patients,^{17,18} whereas others have reported increased mtDNA levels when compared with ARV-unexposed controls.^{19–21} No differences were observed between HIV/ARV-exposed patients and healthy controls in mtDNA deletions or mitochondrial haplotypes,²² mitochondrial RNA content²⁰ or telomere length.^{17,23} Conversely, AC/TG mtDNA mutations were more common in both HIV-infected mothers and their uninfected infants, raising concern about long-term outcomes, because these mutations have been associated with aging and age-associated diseases.²⁴

We recently demonstrated significant decreases in the mitochondrial protein synthesis rate and mitochondrial respiratory chain (MRC) enzyme activity in maternal and umbilical cord blood PBMCs from mother–child pairs exposed to ARV compared with healthy controls.²⁵ Interestingly, only MRC complex II function was preserved, because this is independent of mtDNA depletion. These results are in line with previous studies showing mitochondrial dysmorphology, mtDNA depletion and altered MRC function in placenta and umbilical cord PBMCs from animal models²⁶ exposed to NRTIs and also in ARV-treated HIV-infected pregnant women.^{21,27,28} Two recent studies failed to demonstrate differences in MRC function between HIV/ARV-exposed and

Accepted for publication March 18, 2015.

From the *Infectious Diseases Unit, Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; †Muscle Research and Mitochondrial Function Laboratory, Cellex-IDIBAPS, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ‡Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain; §Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Spain; and ¶Blanquerna School of Health Science, Universitat Ramon Llull, Barcelona, Spain.

The first two authors contributed equally to this study.

Presented at the 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), February 2011, Boston, MA (poster board 750).

Supported by the Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (grant numbers FIPSE 36612/06 and FIPSE 360982/10); Fundació Cellex, Fondo de Investigación Sanitaria (grant numbers FIS 00462/11, FIS 01199/12, FIS01738/13 and FIS 01455/13); Suports a Grups de Recerca de la Generalitat de Catalunya (grant numbers SGR 14/376 and 14/505) and CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER, an initiative of ISCIII).

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Address for correspondence: Clàudia Fortuny, MD, PhD, Infectious Diseases Unit, Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu 2, 08950 Esplugues, Spain. E-mail: cfortuny@hsjdbcn.org.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website (www.pidj.com).

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.
ISSN: 0891-3668/15/3412-1349

DOI: 10.1097/INF.0000000000000894

unexposed neonates, assessed by means of the complex II:IV ratio of cytochrome c oxidase in frozen neonatal PBMCs obtained within the first 48 hours of life.^{19,21} However, no data are available on MRC function over the first months of life, a critical period of time in terms of energy requirements, when an MRC dysfunction would represent an intermediate step in the pathogenic pathway between NRTI-associated mtDNA damage and the potential development of hyperlactatemia and clinical disease in HIV/ARV-exposed healthy infants. We hypothesized that NRTI-related mtDNA depletion would lead to mitochondrial dysfunction in the first year of life in HIV-uninfected infants who were exposed to ARV during gestation, birth and the neonatal period.

MATERIALS AND METHODS

We conducted a prospective observational study of children born to HIV-infected mothers who were followed up in the outpatient clinic of a single tertiary care pediatric center in Barcelona, Spain. From January 2000 to December 2012, 296 mother-child pairs were enrolled in the cohort, and the HIV mother-to-child HIV transmission rate was 2.03% (95% confidence interval: 0.97–3.09); all infants born from January 2000 to May 2005 were eligible for this particular study. As per protocol, informed consent was obtained, and demographic, clinical and laboratory data were routinely collected on all mother-child pairs at enrollment. A clinical interview and a complete physical examination were performed at every visit (at birth, at 2–3 and 6 weeks, at 3, 6 and 12 months of age and yearly thereafter until 18 years of age). Complete blood count and serum biochemistry were obtained together with whole blood proviral HIV-DNA (Amplicor HIV, Roche, Basel, Switzerland) until 2004 and HIV-RNA load quantification (CA HIV-1 Monitor, Roche; limit of <50 copies/mL) thereafter at every visit during the first year of life. Uninfected HIV status beyond the age of 12 months was always confirmed with an HIV antibody test.

Infants were eligible for the study when vertically transmitted HIV infection was ruled out; they had been exposed to ARV during gestation, labor and/or the neonatal period and they did not present any other medical condition that might lead to mitochondrial dysfunction (eg, congenital heart defects or inborn metabolism errors). A control group of age- and gender-matched healthy infants referred to our laboratory for routine blood analysis before elective minor pediatric surgery was used. For ethical reasons, control infants provided a single blood sample each. Study-specific informed consent was obtained from parents or legal guardians, and local ethical committee approval was given.

For this particular study, PBMCs were obtained from 3–5 mL of venous blood at 6 weeks and at 3, 6 and 12 months of age, together with results of routine clinical laboratory tests. PBMCs were isolated on Percoll discontinuous gradients after blood sedimentation in dextran.²⁹ This methodology allows platelet decontamination. Isolated PBMCs were cryopreserved at –80°C and were used to assess the following mitochondrial parameters. Mitochondrial mass (MM) was estimated by citrate synthase (CS) activity (in nmol/min/mg of protein), an enzyme located in the mitochondrial matrix and which acts in Krebs cycle and which is considered a reliable marker of mitochondrial content.^{30,31} As a representative of replication efficiency, mtDNA content was quantified with quantitative real-time polymerase chain reaction (Light-Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche Molecular Biochemicals®, Germany), separately analyzing a fragment of the highly conserved ND2 mitochondrial-encoded (*mtND2*) gene and a sequence of the housekeeping nuclear-encoded RNA polymerase II gene (*nRP2*).³² The results were expressed as the ratio between *mtND2* and *nRP2* genes. As an indicator of functional efficiency, MRC enzymatic activity of complex IV (CIV) was measured

spectrophotometrically (in nmol/min/mg of protein).³³ All absolute measurements were corrected with MM to exclude any influence of mitochondrial proliferation or reduction in such values. This correction was performed by dividing mtDNA content and CIV activity by CS activity. In case of insufficient PBMC sample, the determination of CIV enzymatic activity was prioritized. The evolution over time of venous blood lactate levels obtained at the same time points in this population had already been published and was also used as a marker of mitochondrial function.¹⁵

Other variables that were relevant to this study included mother's age and ethnicity, history of AIDS, hepatitis C virus coinfection, third-trimester HIV RNA viral load and CD4 T-lymphocyte cell count, type and timing of ARV therapy, a history of substance abuse during pregnancy, mode of delivery, intrapartum use of ZDV, infant's sex, Apgar scores, gestational age at birth and birth weight, type and timing of exposure to ARV during the neonatal period and infant's hepatitis C virus status.

Statistical Analysis

Qualitative variables were expressed as percentages, whereas quantitative variables were expressed as mean/median values and standard deviation/range. Normality of data was ascertained with Kolmogorov–Smirnov test. Comparisons between groups were carried out using the Student *t* test, and the association between continuous variables was assessed by means of Pearson correlation test. Nonparametric tests were used as appropriate. All tests were 2 tailed, and a *P* value lower than 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed with the Statistical Package for the Social Sciences version 18.0 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

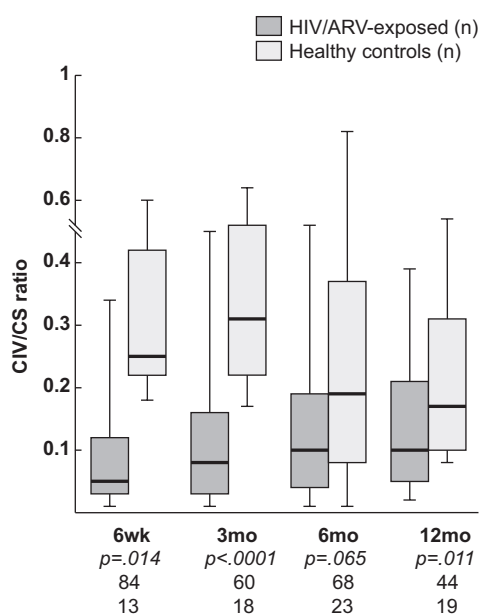
The final study group consisted of 133 consecutive HIV-uninfected ARV-exposed infants born to 126 HIV-infected mothers (including 7 sets of twins) from January 2000 to May 2005; samples from 73 healthy control infants were available for the 4 different timepoints. Previously 5 HIV-exposed children had been excluded because of HIV infection (*n* = 1), congenital heart defects (*n* = 2) and extreme prematurity (*n* = 2). Data regarding gestation, birth and neonatal clinical variables of the HIV/ARV-exposed group are summarized in the Table, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/INF/C251>. In HAART-treated mothers, the mean/median duration of HAART during pregnancy was 29.6/36 weeks (range: 2–40 weeks). Oral ZDV was implemented in most of the neonates at birth; 11 infants (8.3%) received combination ARV prophylaxis because of late diagnosis of maternal HIV infection or uncontrolled viral replication at delivery. Individual and cumulative gestation and total exposure to NRTIs of infants included in the study are summarized in Table 1. None of the ARV-exposed infants developed clinical signs or symptoms consistent with mitochondrial disease during follow-up.

HIV/ARV-exposed infants showed higher nonsignificant mean values in MM (estimated by CS) when compared with controls: 101.9 versus 66.7, 85.1 versus 65.8, 94.7 versus 67.3 and 100.3 versus 93.3 nmol/min/mg of protein, at 6 weeks and 3, 6 and 12 months, respectively (*P* = NS in all cases). Mean mtDNA content (mtND2:RPII ratios normalized by CS) was nonsignificantly lower in HIV/ARV-exposed infants when compared with controls over time: 0.009 versus 0.011, 0.010 versus 0.016, 0.008 versus 0.020 and 0.010 versus 0.014 at 6 weeks and 3, 6 and 12 months, respectively (*P* = NS in all cases). Because of the low number of samples available for mtDNA determination in the control group (6, 8, 12 and 8 samples at 6 weeks and 3, 6, and 12 months of age, respectively), these results should be approached with caution.

TABLE 1. Individual and Cumulative Gestational Exposure to Different Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors and Tenofovir (in Weeks)

Drug	n	Median	Range
Zidovudine (ZDV)	96	26	2–40
Lamivudine (3TC)	125	35	2–40
Stavudine (d4T)	35	37	2–39
Didanosine (ddI)	18	37	11–40
Abacavir (ABC)	4	27	17–37
Tenofovir (TDF)	2	38.5	37–40
Gestational cumulative exposure to different NRTIs	127	66	4–111
Prenatal and postnatal cumulative exposure to different NRTIs	133	54	6–117

Note that some children were exposed to >2 drugs because of changes in maternal HAART regimens during pregnancy.

**FIGURE 1.** Evolution over time of mitochondrial respiratory CIV enzymatic activity expressed as nmol/min/mg of protein normalized by mitochondrial mass estimated by CS activity in HIV/ARV-exposed infants and healthy controls. Solid line represents the median, the box represents the interquartile range and the range is indicated by a vertical bar.

Conversely, MM-normalized mean CIV enzymatic activities were consistently lower in HIV/ARV-exposed infants at all time points: 0.09 versus 0.35 ($P = 0.014$), 0.12 versus 0.38 ($P < 0.0001$), 0.13 versus 0.24 ($P = 0.065$) and 0.14 versus 0.24 ($P = 0.011$) nmol/min/mg of protein per mitochondrion at 6 weeks and 3, 6 and 12 months, respectively (Fig. 1). Among HIV/ARV-exposed patients, CIV enzymatic activity showed a linear trend toward normalization with age ($P < 0.01$) and an inverse correlation with mtDNA levels up to the age of 6 months ($r = -0.327$, $P = 0.016$ at 6 weeks; $r = -0.311$, $P = 0.040$ at 3 months and $r = -0.275$, $P = 0.046$ at 6 months), but not at 1 year of age ($r = -0.271$, $P = 0.211$; Fig. 2). CIV enzymatic activity and mtDNA levels did not correlate with mean lactate levels (2.88, 2.78, 1.89 and 1.71 mmol/L at 6 weeks and 3, 6 and 12 months, respectively; normal range: 0.77–2.44 mmol/L) at any of the timepoints.

Neither CIV activity nor mtDNA levels were associated with the rest of the baseline maternal and infant variables, including maternal age, AIDS, ethnicity, hepatitis C virus coinfection, exposure to other drugs during gestation, antepartum CD4 T-lymphocyte cell count and HIV viral load, gestational age at delivery, infant gender, birth weight and Apgar score. When exposure to ARV during gestation was taken into account, neither the type (individual drugs or regimens; Fig. 3) nor the timing of exposure (to an individual drug or the accumulated exposure to different NRTIs) was associated with differences in mtDNA levels or CIV activity, except for the maternal use of ZDV, which was associated with lower mean mtDNA levels at different timepoints: 0.96 versus 1.28 ($P = 0.027$), 0.91 versus 1.15 ($P = 0.071$), 0.77 versus 1.09 ($P = 0.002$) and 0.91 versus 1.28 ($P = 0.037$) mmol/L at 6 weeks and 3, 6 and 12 months, respectively.

DISCUSSION

This is the first study to longitudinally assess mitochondrial function in a cohort of HIV/ARV-exposed healthy infants. Mitochondrial function has been very scarcely investigated in this population. To date, only 2 cross-sectional studies have analyzed the COX II (encoded by mtDNA):COX IV (encoded by nuclear DNA) ratio, 2 subunits of MRC cytochrome c oxidase, in PBMCs obtained within 48 hours of delivery. The authors of both studies^{19,21} reported nonsignificant lower mitochondrial function in infants exposed to ARV (81 and 20 HIV/ARV-exposed infants, respectively) when compared with controls (48 and 26 control infants). Interestingly, both studies observed significantly higher mtDNA content in these neonates as well.^{19,21}

Like the other authors,^{19,21} we used the partially mitochondrially encoded CIV to assess mitochondrial function in frozen PBMCs and then adjusted the enzymatic activity results with MM to correct for possible differences in the absolute number of mitochondria per cell. As hypothesized, we observed lower CIV values in HIV/ARV-exposed children at all timepoints when compared with healthy controls. Our data nicely depict a reversible mitochondrial dysfunction that tends to gradually normalize over the first year of life, and they are in agreement with the previously reported inverse evolution in the plasma lactate levels (from higher to normal values) in the same cohort of patients,¹⁵ although lactate levels and CIV activity values did not correlate in this study. In spite of these findings, none of the patients in our study developed signs or symptoms consistent with mitochondrial dysfunction. Why only a very small percentage of these children develop clinical symptoms may be at least partially related to the mitochondrial threshold effect.⁴ Of note, CIV activity values were still significantly lower in ARV-exposed infants at the age of 12 months, underscoring the fact that early mitochondrial toxicity may persist until later in life and should always be kept in mind by physicians caring for these children.^{34,35} In fact, median age at clinical onset in the 2 largest case series of mitochondrial disease in HIV/ARV-exposed healthy children was 7¹² and 16 months.¹⁴

We observed nonsignificant lower mtDNA levels in HIV/ARV-exposed infants than in controls. In previous studies, conflicting results were reported, with some studies showing mtDNA depletion^{17,18} and others reporting increased mtDNA content when compared with ARV-unexposed controls.^{19–21} Methodological differences regarding how mtDNA results were reported, methods for PBMC isolation, platelet contamination, timing of blood sampling and type and duration of ARV exposure may explain these contradictory results. In our study, we were able to assess mtDNA content longitudinally in a large cohort of HIV/ARV-exposed infants, PBMCs were free of platelets and mtDNA levels were normalized to MM; unfortunately, the number of mtDNA determinations

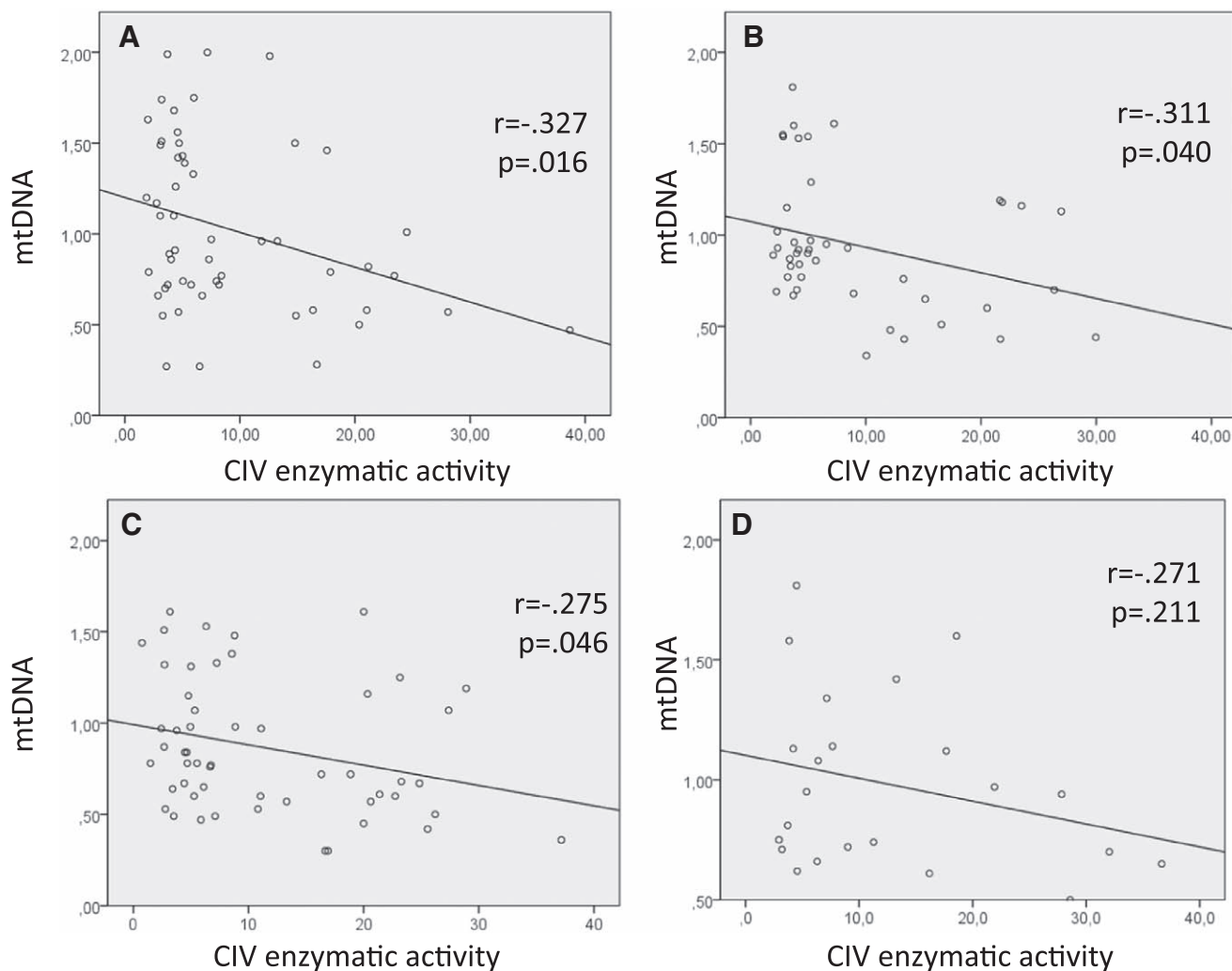


FIGURE 2. Charts showing inverse correlation between mtDNA (y-axis; mtND2:nRPII ratio, absolute values) and CIV enzymatic activity (x-axis; nmol/min/mg of protein, absolute values) in HIV/ARV-exposed children at (A) 6 weeks and (B) 3, (C) 6 and (D) 12 months of age.

in the control group was very low, and this may have hampered our results. In any case, mtDNA levels remained fairly stable (0.009, 0.010, 0.008 and 0.010 mtND2:RPII ratio normalized by CS at 6 weeks and 3, 6 and 12 months of age, respectively) in the HIV/ARV-exposed population and did not show an increasing or decreasing trend over time, as opposed to CIV enzymatic activity. These results are consistent with those reported by Aldrovandi et al¹⁸ in a cohort of 411 healthy HIV-unexposed pediatric patients aged 0–18 years, in whom PBMC mtDNA levels did not show age-related differences.

The mitochondrial toxic effect derived from HIV itself has been well demonstrated in ARV-naïve HIV-infected patients but cannot be directly invoked in the ARV-exposed HIV-uninfected child. Therefore, in this population, other explanations for mitochondrial dysfunction are needed, including NRTI-related toxicity but also possible NRTI-unrelated mechanisms, especially mitochondrial toxicity affecting the maternal tissues associated with fetal development, such as placenta and cord blood.^{19,26,28,36,37} It is unlikely that this phenomenon can be explained solely by a single mechanism; rather it is the end result of several causes and pathogenic pathways.

Leaving aside the controversial results in mtDNA content when compared with controls, several recent studies suggest that an increase in mtDNA content initially counteracts mitochondrial toxicity in the HIV/ARV-exposed infant. Higher mtDNA content in PBMCs has been reported in this population,^{19–21} and, importantly, Aldrovandi et al¹⁸ reported lower mtDNA content in ARV-unexposed infants born to HIV-infected mothers when compared with patients exposed to ZDV monotherapy during gestation, as well as a further increase in those exposed to HAART; moreover, the longer the exposure, the greater the effect on mtDNA.^{18,20} Albeit weak, the inverse correlation between CIV enzymatic activity and mtDNA we observed up to the age of 6 months supports this hypothesis and is consistent with very similar findings reported by Brogly et al²² in a group of 18-month-old HIV/ARV-exposed children who later developed clinical signs of mitochondrial dysfunction. Instead, in the absence of ARV exposure, mtDNA content and mitochondrial function would directly correlate;¹⁹ unfortunately, we could not verify this because of the low numbers.

Although mtDNA content remained stable over time, MM was higher at all timepoints in the HIV/ARV-exposed group, although differences were not statistically significant. This supports

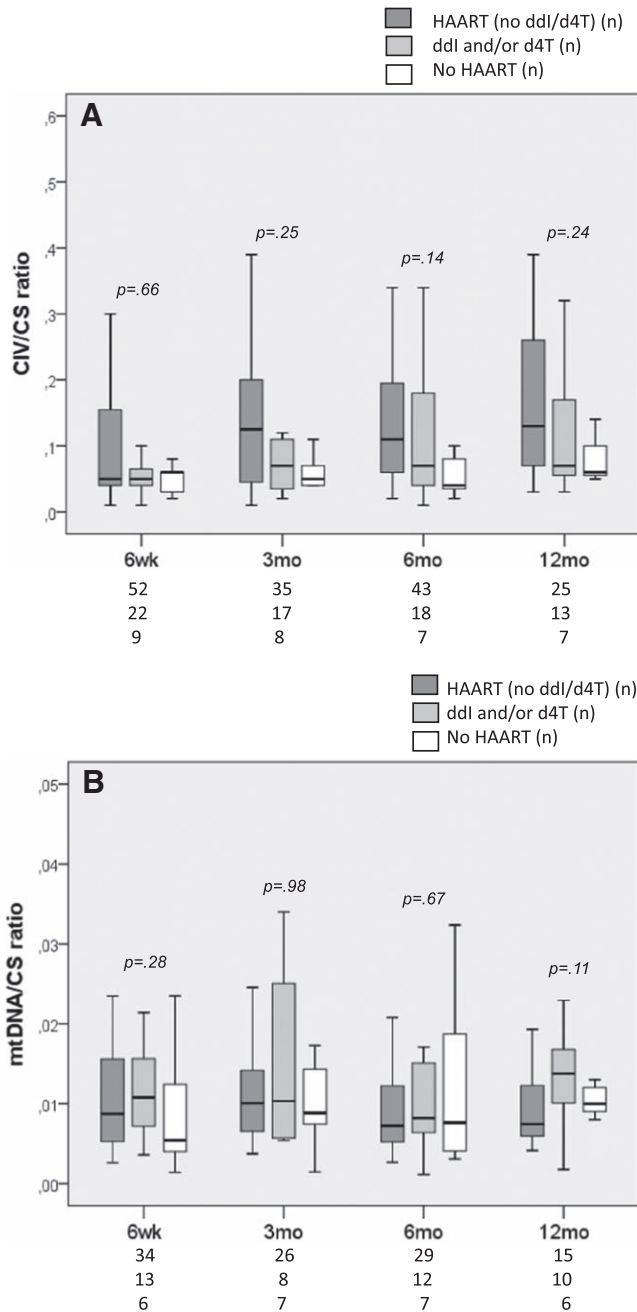


FIGURE 3. CIV enzymatic activities (A; expressed as nmol/min/mg of protein normalized by CS, median values) and mtDNA values (B; expressed as mtND2:nRPII ratios normalized by CS, median values) at all timepoints according to the maternal antiretroviral regimen during gestation [no HAART, no antiretrovirals or zidovudine monotherapy; didanosine (ddl) and/or stavudine(d4T)-based HAART regimens and other HAART regimens]. Solid line represents the median; the box represents the interquartile range and the range is indicated by a vertical bar.

the hypothesis that the increase in mtDNA content reported by others is driven by an increase in the absolute number of mitochondria in PBMCs, rather than by an increase in mtDNA replication, as previously suggested.²¹ Actually, this phenomenon is also observed

in congenital respiratory chain disorders, and subsarcolemmal mitochondrial accumulations remain a minor diagnostic criteria for these disorders in patients younger than 16 years.³⁸

Our observational study has several limitations. First, the number and volume of cryopreserved samples was insufficient to complete planned analysis, especially among controls, and samples from birth were not available. Second, for ethical reasons, a group of ARV-unexposed infants born to HIV-infected mothers was not available, while control healthy patients provided a single sample, potentially leading to higher interindividual variability. Some of the ARVs that the mothers in the study received are no longer recommended, such as didanosine, stavudine and nelfinavir. Current HAART regimens include many new ARVs that were not being used at the time the samples were collected. Newer NRTIs show a much lower propensity to cause mitochondrial toxicity.^{39,40}

In summary, our results show for the first time the decreased mitochondrial function that tends to normalize over the first year of life in HIV/ARV-exposed healthy children. The inverse correlation between mtDNA and CIV activity values suggests an upregulation of the former, although the pathogenic pathway for this remains unclear. Further studies are needed to better characterize mitochondrial toxicity in HIV/ARV-exposed healthy children, with special attention paid to the long-term follow-up of this population into adulthood.

REFERENCES

- Panel on Treatment of HIV-Infected Pregnant Women and Prevention of Perinatal Transmission. *Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1-Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States*. Available at: <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/PerinatalGL.pdf>. Accessed August 5, 2014.
- World Health Organization. *Antiretroviral Drugs for Treating Pregnant Women and Preventing HIV Infection in Infants: Recommendations for a Public Health Approach—2010 Version*. Available at: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599818_eng.pdf. Accessed August 5, 2014.
- Grupo de expertos de la Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida (SPNS), Grupo de Estudio de Sida (GeSIDA)/Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) y Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP). *Documento de consenso para el seguimiento de la infección por el VIH en relación con la reproducción, embarazo, parto y profilaxis de la transmisión vertical del niño expuesto*. Available at: <http://www.mssi.gob.es/en/ciudadanos/enfLeiones/enfTransmisibles/sida/publicaciones/profSanitarios/DocEmbarazoMarzo2013.pdf>. Accessed August 5, 2014.
- Brinkman K, ter Hofstede HJ, Burger DM, et al. Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS*. 1998;12:1735–1744.
- Lim SE, Copeland WC. Differential incorporation and removal of antiviral deoxynucleotides by human DNA polymerase gamma. *J Biol Chem*. 2001;276:23616–23623.
- Carr A, Cooper DA. Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet*. 2000;356:1423–1430.
- Côté HC, Brumme ZL, Craib KJ, et al. Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2002;346:811–820.
- Morén C, Noguera-Julian A, Rovira N, et al. Mitochondrial impact of human immunodeficiency virus and antiretrovirals on infected pediatric patients with or without lipodystrophy. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30:992–995.
- Foster C, Lyall H. HIV and mitochondrial toxicity in children. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:8–12.
- Koczor CA, Lewis W. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor toxicity and mitochondrial DNA. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010;6:1493–1504.
- Maagaard A, Kvale D. Mitochondrial toxicity in HIV-infected patients both off and on antiretroviral treatment: a continuum or distinct underlying mechanisms? *J Antimicrob Chemother*. 2009;64:901–909.
- Blanche S, Tardieu M, Rustin P, et al. Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *Lancet*. 1999;354:1084–1089.

13. Barret B, Tardieu M, Rustin P, et al; French Perinatal Cohort Study Group. Persistent mitochondrial dysfunction in HIV-1-exposed but uninfected infants: clinical screening in a large prospective cohort. *AIDS*. 2003;17:1769–1785.
14. Brogly SB, Ylitalo N, Mofenson LM, et al. In utero nucleoside reverse transcriptase inhibitor exposure and signs of possible mitochondrial dysfunction in HIV-uninfected children. *AIDS*. 2007;21:929–938.
15. Noguera A, Fortuny C, Muñoz-Almagro C, et al. Hyperlactatemia in human immunodeficiency virus-uninfected infants who are exposed to antiretrovirals. *Pediatrics*. 2004;114:e598–e603.
16. Alimenti A, Burdge DR, Ogilvie GS, et al. Lactic acidemia in human immunodeficiency virus-uninfected infants exposed to perinatal antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22:782–789.
17. Poirier MC, Divi RL, Al-Harhi L, et al; Women and Infants Transmission Study (WITS) Group. Long-term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;33:175–183.
18. Aldrovandi GM, Chu C, Shearer WT, et al. Antiretroviral exposure and lymphocyte mtDNA content among uninfected infants of HIV-1-infected women. *Pediatrics*. 2009;124:e1189–e1197.
19. McComsey GA, Kang M, Ross AC, et al; AIDS Clinical Trials Group A5084. Increased mtDNA levels without change in mitochondrial enzymes in peripheral blood mononuclear cells of infants born to HIV-infected mothers on antiretroviral therapy. *HIV Clin Trials*. 2008;9:126–136.
20. Côté HC, Raboud J, Bitun A, et al. Perinatal exposure to antiretroviral therapy is associated with increased blood mitochondrial DNA levels and decreased mitochondrial gene expression in infants. *J Infect Dis*. 2008;198:851–859.
21. Ross AC, Leong T, Avery A, et al. Effects of in utero antiretroviral exposure on mitochondrial DNA levels, mitochondrial function and oxidative stress. *HIV Med*. 2012;13:98–106.
22. Brogly SB, DiMauro S, Van Dyke RB, et al. Short communication: transplacental nucleoside analogue exposure and mitochondrial parameters in HIV-uninfected children. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011;27:777–783.
23. Imam T, Jitratkosol MH, Soudeyans H, et al; CIHR Emerging Team Grant on HIV Therapy and Aging: CARMA. Leukocyte telomere length in HIV-infected pregnant women treated with antiretroviral drugs during pregnancy and their uninfected infants. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012;60:495–502.
24. Jitratkosol MH, Saththa B, Maan EJ, et al; CIHR Emerging Team Grant on HIV Therapy and Aging (CARMA). Blood mitochondrial DNA mutations in HIV-infected women and their infants exposed to HAART during pregnancy. *AIDS*. 2012;26:675–683.
25. Hernández S, Morén C, López M, et al. Perinatal outcomes, mitochondrial toxicity and apoptosis in HIV-treated pregnant women and in-utero-exposed newborn. *AIDS*. 2012;26:419–428.
26. Divi RL, Leonard SL, Kuo MM, et al. Transplacentally exposed human and monkey newborn infants show similar evidence of nucleoside reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Environ Mol Mutagen*. 2007;48:201–209.
27. Gingelmaier A, Grubert TA, Kost BP, et al. Mitochondrial toxicity in HIV type-1-exposed pregnancies in the era of highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther*. 2009;14:331–338.
28. Shiramizu B, Shikuma KM, Kamemoto L, et al. Placenta and cord blood mitochondrial DNA toxicity in HIV-infected women receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitors during pregnancy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;32:370–374.
29. Fluks AJ. Three-step isolation of human blood monocytes using discontinuous density gradients of Percoll. *J Immunol Methods*. 1981;41:225–233.
30. Barrientos A. *In vivo* and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods*. 2002;26:307–316.
31. Pallotti F, Lenaz G. Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines. In: Pon LA, Schon EA, eds. *Methods in Cell Biology*. San Diego, CA: Academic Press; 2001:1–35.
32. Radonić A, Thulke S, Mackay IM, et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313:856–862.
33. Miró O, Cardellach F, Barrientos A, et al. Cytochrome c oxidase assay in minute amounts of human skeletal muscle using single wavelength spectrophotometers. *J Neurosci Methods*. 1998;80:107–111.
34. Lipshultz SE, Shearer WT, Thompson B, et al. Cardiac effects of antiretroviral therapy in HIV-negative infants born to HIV-positive mothers: NHLBI CHAART-1 (National Heart, Lung, and Blood Institute Cardiovascular Status of HAART Therapy in HIV-Exposed Infants and Children cohort study). *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:76–85.
35. Divi RL, Einem TL, Fletcher SL, et al. Progressive mitochondrial compromise in brains and livers of primates exposed in utero to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). *Toxicol Sci*. 2010;118:191–201.
36. Divi RL, Walker VE, Wade NA, et al. Mitochondrial damage and DNA depletion in cord blood and umbilical cord from infants exposed in utero to Combivir. *AIDS*. 2004;18:1013–1021.
37. Gerschenson M, Nguyen V, Ewings EL, et al. Mitochondrial toxicity in fetal *Erythrocebus patas* monkeys exposed transplacentally to zidovudine plus lamivudine. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20:91–100.
38. Bernier FP, Boneh A, Dennett X, et al. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology*. 2002;59:1406–1411.
39. Curran A, Ribera E. From old to new nucleoside reverse transcriptase inhibitors: changes in body fat composition, metabolic parameters and mitochondrial toxicity after the switch from thymidine analogs to tenofovir or abacavir. *Expert Opin Drug Saf*. 2011;10:389–406.
40. Morén C, Noguera-Julian A, Garrabou G, et al. Mitochondrial evolution in HIV-infected children receiving first- or second-generation nucleoside analogues. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012;60:111–116.

Supplemental Digital Content

Table. Clinical and laboratory data from HIV-infected mothers (n=126) and their HIV-uninfected newborns (n=133).

Maternal and gestational characteristics (n=126)	
Mother's age, years (mean \pm SD)	30.9 \pm 5.4
Caucasian, no. of mothers (%)	107 (84.9)
AIDS, no. of mothers (%)	9 (7.1)
Substance abuse during pregnancy, no. of mothers (%)	42 (33.3)
Cigarettes	32 (25.4)
Methadone	14 (11.1)
Heroin	5 (4.0)
Cocaine	3 (2.4)
Alcohol	4 (3.2)
Other drugs	6 (4.8)
Multidrug (\geq 2 drugs) users	9 (7.1)
Gestational ARV treatment, no. of mothers (%)	
No treatment	6 (4.8)
ZDV monotherapy	9 (7.1)
HAART	111 (88.1)
NRTIs: ZDV+3TC	75 (59.5)
3TC+d4T	22 (16.5)
ddl+d4T	8 (6.3)
ZDV+ddl	5 (3.8)
Other combinations (including ABC or TDF)	7 (5.3)
Nevirapine-based regimens	63 (50)
Nelfinavir-based regimens	43 (34.1)
HCV coinfection, no. of mothers (%)	52 (41.3)
Antepartum CD4 cell count/mm ³ (mean \pm SD)	547 \pm 330
Antepartum undetectable viremia, no. of mothers (%)	104 (82.5)

Labor characteristics (n=126)	
Elective cesarean section, no. of mothers (%)	90 (71.4)
Intrapartum ARV treatment, no. of mothers (%)	
No treatment	9 (7.1)
Intravenous ZDV	117 (92.9)
Neonatal characteristics (n=133)	
Female sex, no. of patients (%)	58 (43.6)
1-min and/or 5-min Apgar score <8, no. of patients (%)	10 (7.5)
Gestational age at birth, weeks (mean ± SD)	37.2 ± 1.7
Birth weight, grams (mean ± SD)	2805 ± 491
Neonatal ARV treatment, no. of patients (%)	
6-week oral ZDV	113 (85.0)
4-week oral ZDV	9 (6.8)
ZDV plus nevirapine	7 (5.2)
ZDV plus nevirapine plus 3TC	4 (3.0)
Mother-to-child transmission of HCV, no. of patients (%)	10 (7.5)

ARV, antiretroviral; ZDV, zidovudine; 3TC, lamivudine; d4T, stavudine; ddl, didanosine; ABC, abacavir; TDF, tenofovir; HAART, highly active antiretroviral therapy; HCV, hepatitis C virus; SD, standard deviation

Resum de l'article 4:

Estudi observacional monocèntric en una cohort de pacients ENI seguits de forma ambulatoria a la Unitat de Malalties Infeccioses de l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, nascuts entre el mes de gener de 2000 i maig de 2005.

S'inclouen pacients no infectats pel VIH que han estat exposats durant la gestació, el part i/o el període neonatal a ARV; i s'exclouen aquells que presenten alguna patologia capaç d'interferir en el metabolisme mitocondrial. Es recluta un grup de lactants sans emparellats per edat i gènere, que s'utilitzen com a controls.

Dels pacients inclosos i dels controls s'obté CMSP a partir de sang perifèrica a les 6 setmanes, 3, 6 i 12 mesos de vida, que són criopreservades fins al seu estudi.

Per a caracteritzar el metabolisme mitocondrial, es realitzen els següents estudis: . Activitat CS per espectrofotometria (nmol/min per mg de proteïna), representativa de la massa mitocondrial.

. ADNmt, per PCR quantitativa a temps real (ratio tND2/RPII), reflexe de la capacitat de replicació de les mitocòndries. Resultat corregit per la massa mitocondrial.

. Activitat del CIV de la CRM per espectrofotometria (nmol/min per mg de proteïna). Resultat també corregit per la massa mitocondrial.

Resultats:

S'inclouen 133 pacients (7 parelles de bessons) nascuts de 126 mares amb infecció pel VIH i 73 controls no exposats al VIH.

Es resumeixen a continuació les principals troballes:

. La massa mitocondrial (estimada per l'activitat CS) és major en els lactants ENI que en els controls sans, però sense assolir significació estadística.

. El contingut d'ADNmt/CS és menor en els pacients ENI que en els controls sans, tampoc de forma estadísticament significativa. Els nivells d'ADNmt són estables en el temps (ràtio tND2/RPII corregida per CS: 0,009, 0,010, 0,008 i 0,010 a les 6 setmanes, 3, 6 i 12 mesos, respectivament).

. L'activitat de CIV/CS és significativament menor en els lactants ENI que en els controls sans, en tots els talls temporals: 0,09 vs 0,35 (p=0,035); 0,12 vs 0,38 (p<0,0001); 0,13 vs 0,24 (p=0,065) i 0,14 vs 0,24 (p=0,011) nmol/min per mg de proteïna a les 6

setmanes, 3, 6 i 12 mesos respectivament. L'activitat enzimàtica mostra una tendència cap a la normalització amb el temps ($p < 0,01$).

. En els pacients ENI, s'observa una correlació inversa entre l'activitat CIV i els nivells d'ADNmt fins als 6 mesos de vida ($r = -0,327$, $p = 0,016$ a les 6 setmanes; $r = -0,311$, $p = 0,040$ als 3 mesos; i $r = -0,275$, $p = 0,046$ als 6 mesos), que perd la significació estadística als 12 mesos ($r = -0,271$, $p = 0,211$).

En l'anàlisi del metabolisme mitocondrial en relació a les altres variables estudiades:

. No es detecten diferències en relació a les variables clínic-epidemiològiques (edat materna, situació de la infecció pel VIH en la mare, comorbiditats, consum de tòxics, factors obstètrics i neonatals).

. S'observen menors nivells d'ADNmt en pacients amb exposició prenatal a ZDV al comparar-los amb aquells lactants ENI no exposats a ZDV: 0,96 vs 1,28 ($p = 0,027$), 0,91 vs 1,15 ($p = 0,071$), 0,77 vs 1,09 ($p = 0,002$), i 0,91 vs 1,28 ($p = 0,037$) mmol/L a les 6 setmanes, 3, 6 i 12 mesos, respectivament.

. No es detecten altres associacions entre l'ús matern d'altres ARV i les variables estudiades del metabolisme mitocondrial, ni amb l'ús individual o combinat dels ARV, ni amb la seva durada.

ARTICLE 5

***Mitochondrial dysfunction partially explains macrocytic anemia in
HIV-exposed uninfected infants***

Núria Rovira, Antoni Noguera-Julian, Constanza Morén, Gloria Garrabou, Rebeca
Lahoz, Marc Catalán, Mariona Guitart, Òscar Miró, Clàudia Fortuny

En valoració a la Revista *AIDS Research and Therapy*

1
2
3
4 **MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION PARTIALLY EXPLAINS MACROCYTIC ANEMIA IN HIV-**
5
6 **EXPOSED UNINFECTED INFANTS**
7
8
9

10 Núria ROVIRA¹, Antoni NOGUERA-JULIAN¹, Constanza MORÉN², Glòria GARRABOU², Rebeca
11 LAHOZ³, Marc CATALÁN², Mariona GUITART², Òscar MIRÓ², Clàudia FORTUNY¹.
12
13

14 ¹Infectious Diseases Unit, Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona
15 (Barcelona, Spain); ²Muscle Research and Mitochondrial Function Laboratory, Cellex-IDIBAPS, Faculty of
16 Medicine-Universitat de Barcelona, Internal Medicine Department- Hospital Clínic, (Barcelona, Spain) and
17 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (U722-CIBER, Madrid, Spain) -Fondo
18 Europeo de Desarrollo Regional (FEDER); ³Servei de Pediatria, Hospital Universitari Joan XXIII (Tarragona,
19 Spain).
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 **Email contact:**

35
36 Núria Rovira: nroviragirabal@gmail.com
37

38 Antoni Noguera-Julian: ton@hsjdbcn.org
39

40 Constanza Morén: cmoren1@clinic.ub.es
41

42 Gloria Garrabou: GARRABOU@clinic.ub.es
43

44 Rebeca Lahoz: rebecalahoz@gmail.com
45

46 Marc Catalan: MACATALA@clinic.ub.es
47

48 Mariona Guitart: MGUITART@clinic.ub.es
49

50 Òscar Miró: omiro@clinic.ub.es
51

52 Clàudia Fortuny: cfortuny@hsjdbcn.org
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Corresponding author

Núria Rovira, PhD
Infectious Diseases Unit, Pediatrics Department,
Hospital Sant Joan de Déu
Passeig Sant Joan de Déu 2, 08950 Esplugues (Spain)
Phone number: +34 93 280 40 00;
fax number: +34 93 203 39 59
mail: nroviragirabal@gmail.com

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Keywords: anemia; antiretrovirals; HIV-exposed uninfected infants; mitochondria; neutropenia.

1
2
3
4 **ABSTRACT**
5

6 *Background:* Antiretroviral drugs are successfully used to prevent mother-to-child transmission of HIV
7 worldwide. Hematological and mitochondrial disturbances have been extensively reported among HIV-
8 exposed uninfected (HEU) infants, but their pathogenic mechanisms remain largely unexplained. We aimed to
9 analyze the relationship between hematological values and mitochondrial markers in a large cohort of HEU
10 infants.
11

12 *Methods:* A single-center prospective observational study was conducted among a cohort of HEU patients.
13 Hematological values and mitochondrial markers (peripheral blood mononuclear cells mitochondrial DNA
14 [mtDNA] and mitochondrial respiratory chain complex IV [CIV] function, corrected by citrate synthase [CS]
15 activity) were collected at 6 weeks and 3, 6 and 12 months of age; the former were classified according to
16 Division of AIDS toxicity (DAIDS) Grades. Joint analysis of mitochondrial and hematological data was
17 performed.
18

19 *Results:* Overall, 118 HEU infants were included. Macrocytic, mild and transitory anemia affected 63.6%,
20 47.5% and 17.8% of infants at 3, 6 weeks and 3 months of life, respectively. Significantly lower mtDNA/CS
21 levels were observed among patients exposed to zidovudine (ZDV) during gestation at 3 (0.008 vs. 0.014
22 mtND2/nRPII ratio normalized by CS, p=0.043) and 6 months of life (0.007 vs. 0.013, p=0.023). Patients
23 with anemia DAIDS grade ≥ 2 had a lower CIV/CS activity at 6 weeks of life (0.05 vs. 0.11, p=0.002) with no
24 differences in mtDNA/CS content.
25

26 *Conclusions:* Mitochondrial dysfunction may partially explain ZDV-related macrocytic anemia observed in
27 HEU infants. Other pathogenic pathways associated with ZDV exposure, but also with other HIV-related and
28 unrelated variables, are probably involved.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **BACKGROUND**
5

6 The prevention of mother-to-child transmission (MTCT) of HIV remains one of the major successes in the
7 period since the beginning of the HIV/AIDS pandemic. It is mainly driven by maternal use of highly active
8 antiretroviral (ARV) therapy that leads to suppression of viral replication throughout pregnancy and delivery.
9
10 However, the potential toxicity of ARV exposure in the HIV-exposed uninfected (HEU) infant remains of
11 concern, especially in the long-term [1,2]. Hematological and mitochondrial toxicity are by far the most
12 common adverse effects observed to date in HEU children during the first months of life [1,2].
13
14 Early self-limited macrocytic anemia was first described in AIDS Clinical Trial Group 076 study as a
15 consequence of zidovudine (ZDV) exposure [3], this was later confirmed by other authors [4-6]. Other
16 hematological cell lines can be affected as well, although less commonly and to a lesser extent [6].
17
18 Mitochondrial toxicity is mainly caused through the inhibition of DNA- γ - polymerase by nucleoside analogue
19 reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), which interferes with mitochondrial DNA replication and repair [7].
20
21 Mitochondrial toxicity is thought to be very rarely symptomatic, but severe and even fatal cases have been
22 described [8], and the potential for its long-term consequences remains uncertain.
23
24 We aimed to analyze the relationship between hematological values and mitochondrial markers in a large
25 cohort of HEU infants followed-up in the first year of life.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **MATERIALS AND METHODS**
39

40 A single-center prospective observational study was conducted in a tertiary care hospital in Barcelona (Spain)
41 among a cohort of healthy HEU infants who were exposed to HIV and ARV during gestation, birth and the
42 neonatal period. From January 2000 to December 2014, 320 mother-child pairs were included in the cohort,
43 the current MTCT rate being 1.88% (95% CI: 0.91-3.98). Informed consent is obtained from all mothers at
44 enrollment and local ethics committee approved the study protocol. Demographic, clinical and laboratory data
45 of both mother and infant are routinely collected at enrollment, including ARV history during pregnancy,
46 delivery and neonatal period. Complete clinical assessment is performed at every visit (at birth, 2-3 and 6
47 weeks, 3, 6 and 12 months, and yearly thereafter) as are blood tests per protocol to determine HIV infection
48 status and to detect potential toxicity of ARV prophylaxis. Lab tests consist of complete blood count, serum
49 biochemistry and plasma proviral HIV-DNA (Amplicor HIV; Roche, Basel, Switzerland) until 2004, and
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 HIV-RNA load quantification (CA HIV-1 Monitor, Roche, Basel, Switzerland; limit of < 50 copies/mL)
5
6 afterwards. HIV infection is ruled out as per National Guidelines [1].
7

8 For this particular study, all infants born from January 2000 to May 2005 were eligible. Exclusion criteria
9
10 were MTCT of HIV or HCV infection, gestational age at birth < 36 weeks and any other clinical condition
11
12 that could lead to mitochondrial or hematological dysfunction. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)
13
14 were obtained from 3-5 mL of venous blood to assess mitochondrial genetic content and function at 6 weeks,
15
16 and 3, 6 and 12 months. Mitochondrial DNA (mtDNA, as the ND2 mitochondrial-encoded [mtND2]
17
18 gene/nuclear-encoded RNA polymerase II [nRPII] gene ratio) and cytochrome c oxidase activity (complex IV
19
20 or CIV, in nmol/min per mg of protein) were measured and corrected by citrate synthase (CS) activity (in
21
22 nmol/min per mg of protein), representative of mitochondrial mass; extensive methods and results on
23
24 mitochondrial genetics and function have been previously reported [9].
25

26 The following hematological variables were collected at 3 and 6 weeks, and at 3, 6 and 12 months of age:
27
28 hemoglobin (Hb; g/L), mean corpuscular volume (MCV; fL) and leukocyte, neutrophil, lymphocyte cells
29
30 ($10^9/\text{mm}^3$) and platelet counts ($10^9/\text{L}$), and these were classified according to toxicity grades established by
31
32 the Division of Acquired Immunodeficiency Syndrome (DAIDS), recently updated [10].
33

34 *Statistical analysis.* Categorical and continuous variables were described as percentages and mean/median
35
36 values and standard deviation/ranges, respectively. To compare unrelated variables, Student's t-test was used
37
38 for normally distributed data; the Mann-Whitney U test was applied to non-normally distributed data.
39
40 Pearson's and Spearman test were used to identify correlations between quantitative variables. A multivariate
41
42 analysis to identify factors related to both mitochondrial and hematological parameters was performed;
43
44 factors examined included those showing a significant association in the bivariate analysis and/or having
45
46 clinical relevance. The analysis was carried out using SPSS 17.0 Software, and statistical significance was set
47
48 at $p \leq 0.05$.
49
50

51 52 53 **RESULTS**

54
55 Between January 2000 and May 2005, 138 mother-infant pairs were enrolled in the cohort, of whom 20 were
56
57 excluded (gestational age at birth <36 weeks, n=17; congenital heart defects, n=2; and MTCT HIV infection,
58
59 n=1). Finally, 118 ARV-exposed infants (4 sets of twins and 8 pairs of siblings) born to 106 HIV-infected
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 mothers were included in the study. Mother-infant pairs, gestation and main birth variables are summarized in
5
6 Table 1. Most mothers (87.7%) received HAART, 63% of them from the first trimester of pregnancy. The
7
8 most commonly used ARV drugs were lamivudine (n=88, 77.2%), ZDV (n=84, 73.7%) and stavudine (n=28,
9
10 24.6%) in combination with either nevirapine (n=56, 49.1%) or nelfinavir (n=39, 34.2%). Only 8 mothers
11
12 received ZDV monotherapy starting at 28 weeks of pregnancy, all of them before the year 2003. All newborns
13
14 received ARV prophylaxis, mostly ZDV monotherapy during 6 weeks. No infant showed clinical symptoms
15
16 consistent with mitochondrial dysfunction in the first year of life.

17
18 With regard to hematological parameters, macrocytic anemia was observed in 63.6%, 47.5% and 17.8% of
19
20 infants at 3 and 6 weeks, and 3 months of life, respectively, of whom only 21.6%, 11.9% and 2% were
21
22 DAIDS grade ≥ 2 . No transfusion therapy or early discontinuation of ARV prophylaxis was required. A
23
24 highly significant trend ($p < 0.001$) towards normalization of both Hb and MCV levels was observed after 6
25
26 weeks of age, attaining normal values at 6 months of life in all cases.

27
28 The highest neutropenia prevalence (10.9%) was observed at 6 weeks of age. Taking into account all time
29
30 points, self-limited grade 2 neutropenia was observed in 4 different infants, and was not associated with
31
32 clinically relevant infections; no grade 3-4 neutropenia was detected. No other relevant results were identified
33
34 in the rest of the cell lines (data not shown). No significant correlation was identified between ARV exposure
35
36 and Hb concentration, MCV, leucocyte, neutrophil, lymphocyte or platelet counts during follow-up.

37
38 Overall, mtDNA/CS was measured in 52, 42, 50 and 27 children and CIV/CS enzymatic activity in 73, 55, 61
39
40 and 39 infants at 6 weeks and 3, 6 and 12 months of age, respectively. Patients whose mother received ZDV
41
42 had lower mtDNA/CS levels at all time points, although statistical significance after adjusting for
43
44 confounding variables (maternal age, ethnicity, HIV viral load, CD4+ cell count and drug use, and Apgar
45
46 score below 8 at 1 and/or 5 minutes of life) was found only at 3 (mean values 0.008 vs. 0.014 mtND2/nRPII
47
48 ratio normalized by CS; $p=0.043$) and 6 months of age (0.007 vs. 0.013; $p=0.023$) (Figure 1).

49
50 Lower mean CIV/CS activity was observed at 6 weeks of life among infants with grade ≥ 2 anemia (0.05 vs.
51
52 0.11; $p=0.002$). This finding remained statistically significant ($p=0.042$) after logistic regression including
53
54 maternal age, ethnicity, HIV viral load, CD4+ cell count and drug use, and Apgar score below 8 at 1 and/or 5
55
56 minutes of life. No other relationships between DAIDS toxicity grades and CIV/CS or mtDNA/CS values
57
58 were found during follow-up. Continuous hematological values, including Hb concentration, white cell and
59
60

1
2
3
4 platelet counts, were also not associated with mitochondrial parameters.
5
6
7

8 **DISCUSSION**

9
10 Hematological toxicity remains the most common adverse effect of ARV in HEU infants, although it is
11 usually non-symptomatic and self-limited. According to the recently updated version of DAIDS toxicity
12 grades [10], with noticeably higher thresholds for anemia and neutropenia, the prevalence rates we observed
13 for anemia and neutropenia in our series were lower than those previously described by other authors (25.8-
14 53.8% for DAIDS grade ≥ 2 anemia and 14.6-48.0% for neutropenia), although Hb and neutrophil absolute
15 values were very similar [4-6].
16
17

18 With regard to mitochondrial toxicity, mtDNA depletion, general impairment of mitochondrial respiratory
19 chain, and an increase in apoptosis and oxidative stress have been demonstrated in the HIV-infected ARV-
20 treated child [11]. Mitochondrial disturbances have also been observed in the HEU infant. We recently
21 reported consistently lower CIV enzymatic activity during the first 12 months of life among HEU infants as
22 compared to unexposed controls, but no difference in mtDNA levels, which inversely correlated with CIV
23 activity [9]. These findings are in line with the results of other groups reporting biochemical and genetic
24 findings consistent with mitochondrial impairment in placenta, cord and neonatal PBMCs of HEU infants
25 [12].
26
27

28 In the HEU infant, mainly fetal and neonatal exposure to ZDV have been blamed for the development of
29 macrocytic anemia, with a nadir in Hb levels at 6 weeks of age, which normalizes in some weeks upon
30 interruption of the neonatal prophylactic treatment [3-6]. In contrast, mitochondrial toxicity has been
31 associated with different NRTIs, but especially with stavudine and/or didanosine exposure, and even with
32 HIV itself [7]. Mitochondrial markers (lactate levels or CIV enzymatic activity) steadily normalize over the
33 first year of life in the HEU patient and associated symptoms, albeit very rare, have been described beyond
34 the age of 12 months in most cases [8]. The differing natural histories of hematological and mitochondrial
35 toxicities in the HEU infant suggests different pathogenic pathways [9,12].
36
37

38 This is the first study to longitudinally analyze the relationship between hematological toxicity and
39 mitochondrial function markers in a large cohort of HEU infants during the first year of life. Interestingly,
40 CIV/CS activity was lower in those infants with DAIDS grade ≥ 2 anemia at 6 weeks of age. No other
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 associations between mitochondrial parameters or specific ARV drug use and hematological toxicity grades
5
6 or continuous hematological values were observed.

7
8 Zidovudine is known to have a potent inhibitor effect on the replication of hematopoietic precursors, the
9
10 erythroid line being the most sensitive [13], especially during fetal life. Some mitochondrial-related
11
12 mechanisms have been hypothesized for this toxicity: a depletion in mtDNA/nuclear DNA ratio and increased
13
14 lactate levels were reported in ZDV-exposed hematopoietic cell cultures [13], and an impairment in the
15
16 mitochondrial production of heme group has been described in an animal model as well, with secondary
17
18 transferrin receptor overexpression and cellular iron overload [14], mimicking sideroblastic anemias. In
19
20 contrast, other potential pathogenic mechanisms may be independent of mitochondrial metabolism, including
21
22 a disruption in globin synthesis, a decrease in the levels of the transcription factors involved in erythroid cells
23
24 differentiation [15] and a ZDV concentration-dependent decrease in erythropoietin receptor expression and its
25
26 mRNA levels [16]. We observed lower mtDNA levels at 3 and 6 months of age in HEU infants exposed to
27
28 ZDV during gestation. Although very preliminary, these results also point to mitochondrial dysfunction as
29
30 one of the causes of hematological toxicity in the HEU infant.

31
32 In our study, mitochondrial markers were not associated with neutropenia or abnormal findings in the rest of
33
34 the hematological cell lines. Several studies have reported subtle long-term abnormalities on platelet and
35
36 neutrophil counts and lymphocyte subsets and function in HEU children, which have been associated with
37
38 exposure to ARV [6], but also to maternal CD4+ count and HIV viral load [17]. Importantly, these findings
39
40 have shown no clinical relevance to date, and in industrialized countries, the increased incidence of bacterial
41
42 infections in the first year of life in HEU infants has been attributed rather to weakened humoral immunity
43
44 [18], possibly due to an altered mother-to-child IgG transfer through the placenta [19].

45
46 Our observational study has several limitations, including lack of hematological and mitochondrial maternal
47
48 data, a lack of baseline neonatal birth values, the absence of a control group of HEU ARV-unexposed infants
49
50 for obvious ethical reasons, and the low number of samples available for mitochondrial analysis at some time
51
52 points. Besides these, some of the ARVs the mothers in the study received (stavudine, didanosine, nelfinavir)
53
54 have been replaced by new drugs, including several NRTIs with a lower propensity to mitochondrial toxicity
55
56 [20].
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

CONCLUSIONS

In summary, our results suggest that mitochondrial toxicity may partially explain ZDV-related macrocytic anemia observed in HEU infants. Most probably, this toxicity is the result of several additive pathogenic pathways associated with ZDV exposure, but also with other HIV-related and unrelated variables (i.e. maternal and neonatal use of other ARVs, other MTCT infections, or gestational age and weight at birth).

While daily ARV use prevents hundreds of new MTCT HIV infections worldwide, further studies are needed to better characterize ARV-related toxicities in HEU children, with special attention paid to long-term follow-up of this population into adulthood.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

NR and ANJ are the main authors of de manuscript, designed the study, selected cases, obtained clinical data, analysed and discussed the results and wrote the manuscript. RL was in charge of inclusion of hematological data. CF is the head of the Infectious Disease Unit of the paediatric hospital, who coordinated the study and was in charge of the final review of the study.

CM was in charge of most of experimented procedures. MC was responsible for the enzymatic activities measurement. MGM was responsible for the analysis of the total cell protein content. GG is the postdoctoral research who coordinates the experimental research procedures. OM is a clinical of internal medicine department and member of muscle research and mitochondrial function laboratory, who reviewed the final version of the draft.

All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España [grant numbers FIPSE 36612/06, FIPSE 360982/10]; Fundació Cellex, Fondo de Investigación Sanitaria [grant numbers FIS 00462/11, FIS 01199/12, FIS01738/13, FIS 01455/13]; Suports a Grups de Recerca de la Generalitat de Catalunya [grant numbers SGR 14/376 and 14/505] and CIBER de Enfermedades Raras (CIBER, an initiative of ISCIII).

1
2
3
4 **REFERENCES**
5
6

- 7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
1. Grupo de expertos de la Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida (SPNS), Grupo de Estudio de Sida (GeSIDA), Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) y Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP). Documento de consenso para el seguimiento de la infección por el VIH con relación a la reproducción, el embarazo y la prevención de la transmisión vertical. Available at: <http://www.gesida-seimc.org/contenidos/guiasclinicas/2013/gesidadcyrc2013-SeguimientoInfVIHEmbarazo.pdf>. Accessed on February 4th 2016.
 2. Panel on Treatment of HIV-Infected Pregnant Women and Prevention of Perinatal Transmission. Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1-Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States. August 2015. Available at: <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/PerinatalGL.pdf>. Accessed on February 4th 2016.
 3. Sperling RS, Shapiro DE, McSherry GD et al. Safety of the maternal- infant zidovudine regimen utilized in the Pediatric AIDS Clinical Trial Group 076 study. *AIDS* 1998; 12: 1805-1813.
 4. Le Chenadec J, Mayaux MJ, Guihenneuc-Joyaux CH et al. Perinatal antiretroviral treatment and hematopoiesis in HIV-uninfected infants. *AIDS* 2003; 17: 2053-2061.
 5. Bunders MJ, Bekker V, Scherpbier J, Boer K, Godfried M, Kuijpers TW. Haematological parameters of HIV-1-uninfected infants born to HIV-1-infected mothers. *Acta Paediatrica* 2005; 94: 1571-1577.
 6. Pacheco SE, McIntosh K, Lu M et al. Effect of perinatal antiretroviral drug exposure on hematologic values in HIV-uninfected children: an analysis of The Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis* 2006; 194: 1089-1097.
 7. Brinkman K, Hofstede H, Burger D, Smeitink J and Koopmans P. Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS* 1998, 12: 1735–1744.
 8. Blanche S, Tardieu M, Rustin P et al. Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antirretroviral nucleoside analogues. *Lancet* 1999; 354: 1084-1089.
 9. Noguera-Julian A, Morén C, Rovira N et al. Decreased mitochondrial function among healthy infants exposed to antiretrovirals during gestation, delivery and the neonatal period. *Ped Infect Dis J*

- 1
2
3
4 2015, 34(12):1349-1354.
- 5
6 **10.** Division of AIDS (DAIDS) Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events.
7
8 Version 2.0 November 2014. Available at: [http://rsc.tech-](http://rsc.tech-res.com/Document/safetyandpharmacovigilance/DAIDS_AE_Grading_Table_v2_NOV2014.pdf)
9
10 [res.com/Document/safetyandpharmacovigilance/DAIDS_AE_Grading_Table_v2_NOV2014.pdf](http://rsc.tech-res.com/Document/safetyandpharmacovigilance/DAIDS_AE_Grading_Table_v2_NOV2014.pdf).
11
12 Accessed on February 4th 2016.
- 13
14 **11.** Moren C, Garrabou G, Noguera-Julian A et al. Study of oxidative, enzymatic mitochondrial
15
16 respiratory chain function and apoptosis in perinatally HIV-infected pediatric patients. *Drug Chem*
17
18 *Toxicol* 2013; 36: 496–500.
- 19
20 **12.** Ross AC, Leong T, Avery A et al. Effects of in utero antiretroviral exposure on mitochondrial DNA
21
22 levels, mitochondrial function and oxidative stress. *HIV Medicine* 2012; 13: 98-106.
- 23
24 **13.** Lewis LD, Amin S, Civin CI, Letman PS. Ex vivo zidovudine (AZT) treatment of CD34+ bone
25
26 marrow progenitors causes decreased steady state mitochondrial DNA (mtDNA) and increased
27
28 lactate production. *Hum Exp Toxicol* 2004; 23:173-185.
- 29
30 **14.** Pollack S, Weaver J. Azidothymidine (AZT)-induced siderosis. *Am J Hematol* 1993; 43: 230- 233.
- 31
32 **15.** Bridges EG, Trentesaux C, Lahlil R et al. 3'-azido-3'-deoxythymidine inhibits erythroid- specific
33
34 transcription factors in human erythroid K562 leukemia cells. *Eur J Haematol* 1996; 56: 62-67.
- 35
36 **16.** Gogu SR, Malter JS, Agrawal KC. Zidovudine-induced blockade of the expression and function of
37
38 the erythropoietin receptor. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 1009-1012.
- 39
40 **17.** Kakkar F, Lamarre V, Ducruet T et al. Impact of maternal HIV-1 viremia on lymphocyte subsets
41
42 among HIV-exposed uninfected infants: protective mechanism or immunodeficiency. *BMC Infect*
43
44 *Dis* 2014; 14: 236.
- 45
46 **18.** Taron-Brocard C, Le Chenadec J, Faye A et al. Increased risk of serious bacterial infections due to
47
48 maternal immunosuppression in HIV-exposed uninfected infants in a European country. *Clin Infect*
49
50 *Dis* 2014; 59: 1332-1345.
- 51
52 **19.** Jones CE, Naidoo S, De Beer C, Esser M, Kampmann B, Hesselning AC. Maternal HIV infection and
53
54 antibody responses against vaccine-preventable diseases in uninfected infants. *JAMA* 2011; 305:
55
56 576-584.
- 57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

20. Curran A, Ribera E. From old to new nucleoside reverse transcriptase inhibitors: changes in body fat composition, metabolic parameters and mitochondrial toxicity after the switch from thymidine analogs to tenofovir or abacavir. *Expert Opin Drug Saf* 2011; 10: 389-406.

LIST OF ABBREVIATIONS

ARV: antiretroviral

CIV: complex IV

CS: citrate synthase

DAIDS: Division of AIDS

Hb: hemoglobin

HEU: HIV-exposed uninfected

MCV: mean corpuscular volume

MTCT: mother-to-child transmission

mtDNA: mitochondrial DNA

NRTIs: nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

ZDV: zidovudine

ETHICS APPROVAL

This study was approved by the Hospital Sant Joan de Déu Foundation Ethics Committee.

Table 1. Main maternal, gestational, birth and neonatal clinical and biological variables. Figures expressed as number (percentages), except when stated otherwise.

<i>Mothers</i> (n=106)	
Caucasian	84 (79.2)
AIDS	5 (4.7)
Substance abuse	38 (35.8)
Cigarettes	31 (29.2)
Methadone	10 (9.4)
Heroin	4 (3.8)
Cocaine	2 (1.9)
Alcohol	3 (2.8)
Others	6 (5.7)
Multidrug (2 or more drugs)	7 (6.6)
HCV co-infection	42 (39.6)
<i>Gestation and delivery</i> (n=114)	
Mother's age, mean (SD)	30.5 (5.2)
ARV treatment during pregnancy	
No treatment	6 (5.3)
ZDV monotherapy	8 (7.0)
HAART	100 (87.7)
From 1st trimester	63 (55.3)
PI-based	48 (42.1)
NNRTI-based	56 (49.1)
CD4+ cell count at delivery (cells/mm ³), mean (SD)	578 (340)
Undetectable viremia at delivery	84 (73.7)
Elective caesarian section	83 (72.8)
<i>Intrapartum</i> ARV treatment	

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

No treatment	7 (6.1)
Intravenous ZDV	103 (90.4)

<i>Newborn</i> (n=118)	
Female	53 (44.9)

Apgar below 8 at 1 or 5 minutes	7 (5.9)
---------------------------------	---------

Gestational age (weeks), mean (SD)	37.6 (1.1)
------------------------------------	------------

Birth weight (g), mean (SD)	2880 (440)
-----------------------------	------------

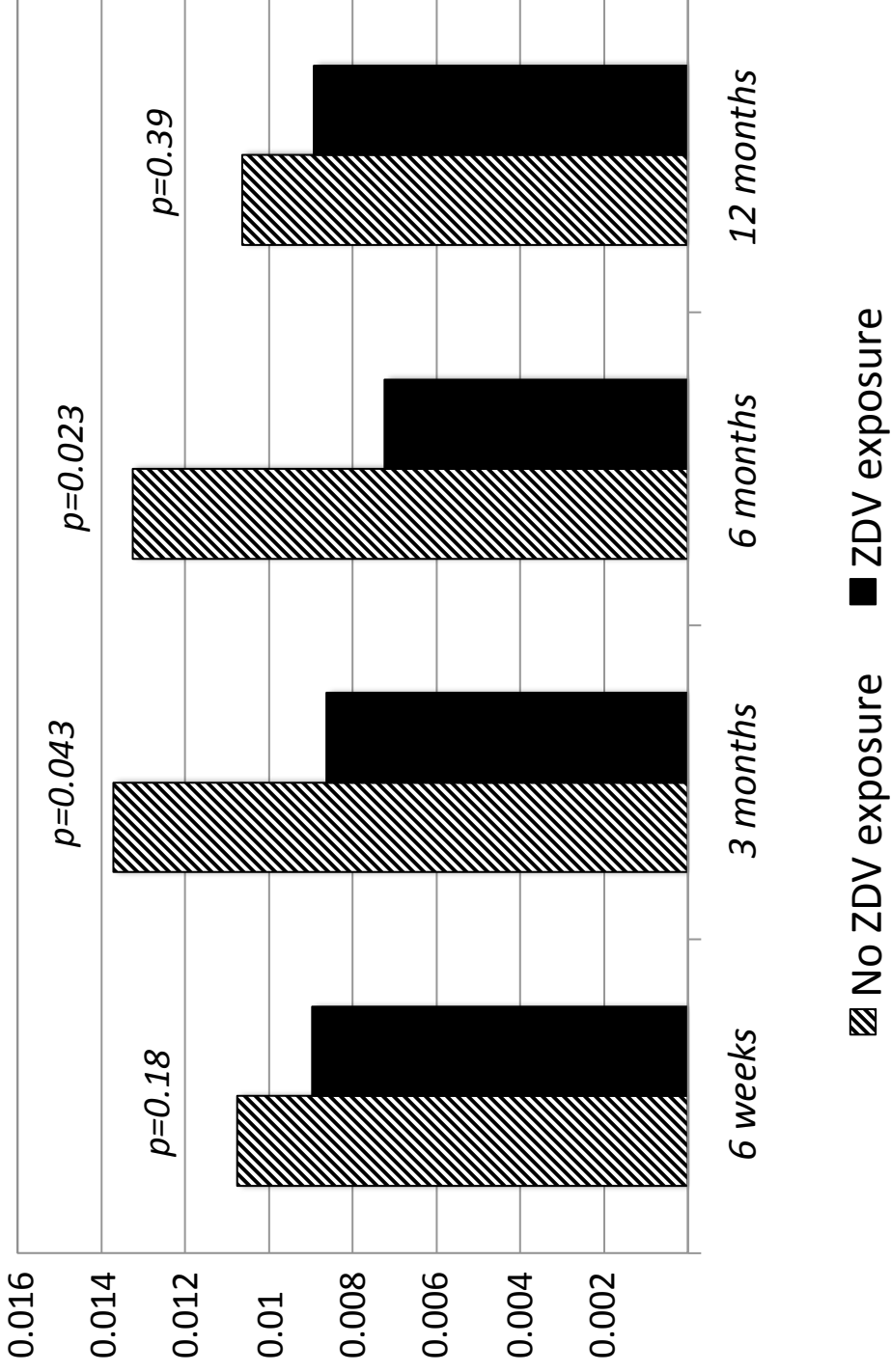
ARV prophylaxis in newborn	
Oral ZDV	107 (90.7)
Others	11 (9.3)

ARV, antiretroviral; HCV, hepatitis C virus; ZDV, zidovudine; HAART, highly active antiretroviral therapy;
PI, protease inhibitor; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1. Mitochondrial DNA (mtDNA, mtND2/nRPII ratio), corrected with citrate synthase (CS) activity, according to maternal use of zidovudine (ZDV) during gestation.

mtDNA/CS



Resum de l'article 5:

Metodologia:

Estudi monocèntric, observacional i prospectiu realitzat a l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, en la cohort de pacients fills de mare amb infecció VIH no infectats, però exposats al VIH i a ARV.

S'inclouen els pacients nascuts des de gener de 2000 a maig de 2005; i s'exclouen aquells amb infecció pel VIH de transmissió vertical, els prematurs i els que presenten qualsevol situació clínica susceptible d'associar disfunció mitocondrial.

Es recullen dades clínico-epidemiològiques i de laboratori, a partir dels controls analítics realitzats de forma rutinària en el seguiment d'aquests pacients.

Per tal d'estudiar el metabolisme mitocondrial, s'aïllen CMSP a partir de sang venosa obtinguda a les 6 setmanes, 3, 6 i 12 mesos de vida. En aquestes mostres es determina:

- . Activitat CS per espectrofotometria (nmol/min per mg de proteïna), representativa de la massa mitocondrial.
- . ADNmt per PCR quantitativa en temps real (ràtio tND2/RPII), reflex parcial de la capacitat de replicació de les mitocòndries. Resultat corregit per la massa mitocondrial.
- . Activitat del CIV de la CRM per espectrofotometria (nmol/min per mg de proteïna). Resultat també corregit per la massa mitocondrial.

Pel que fa als valors hematològics, es recullen a les 3 i 6 setmanes, 3, 6 i 12 mesos de vida, els següents paràmetres: hemoglobina (Hb; en g/L), volum corpuscular mig (VCM; en fL) i recompte de leucòcits, neutròfils, limfòcits ($10^9/\text{mm}^3$) i plaquetes ($10^9/\text{L}$). Tant l'Hb com el recompte de neutròfils es classifiquen d'acord amb els graus de toxicitat establerts per la Division of Acquired Immunodeficiency Syndrome (*DAIDS 2014*), revisada recentment.

Resultats:

S'inclouen un total de 118 lactants ENI en l'estudi.

Els principals resultats obtinguts es descriuen a continuació:

. S'observa anèmia macrocítica en el 63,6%, 47,5%, i 17,8% dels lactants ENI a les 3, 6 setmanes, i 3 mesos de vida, respectivament, de les quals només el 21,6%, 11,9% i 2,0% es consideren rellevants clínicament (definides per grau de DAIDS ≥ 2). Tant l'Hb com el VCM mostren una tendència significativa cap a la normalització en la determinació dels 6 mesos de vida.

. La prevalença més elevada de neutropènia (10,9 %) s'observa a les 6 setmanes de vida. No s'observa cap cas de neutropènia de grau DAIDS 3 o 4, ni tampoc complicacions infeccioses associades.

. No s'observa cap correlació entre l'exposició a ARV i els paràmetres hematològics estudiats.

. Els pacients exposats prenatalment a ZDV presenten nivells inferiors d'ADNmt/CS en tots els talls temporals, que només mostren significació estadística en l'anàlisi multivariant als 3 i 6 mesos de vida (0,008 vs 0,014, $p=0,043$ i 0,007 vs 0,013, $p=0,023$; respectivament).

. Els pacients amb anèmia de grau DAIDS ≥ 2 presenten menor activitat de CIV/CS a les 6 setmanes de vida (0,05 vs 0,11; $p=0,023$).

. No s'observa cap altra associació entre les variables del metabolisme mitocondrial i les dades de toxicitat hematològica.

V. Discussió

ARTICLE 1:

Antiretroviral-related hematologic short-term toxicity in healthy infants.

Implications of the new neonatal 4-week zidovudine regimen.

Lahoz R, Noguera-Julian A, Rovira N, Català A, Sànchez E, Jiménez R, Fortuny C.

The Pediatric Infectious Disease Journal 2010, Volum 29 (4): 376-79.

L'ús de fàrmacs ARV en la prevenció de la transmissió vertical del VIH és fonamental. La ZDV fou el primer fàrmac ARV emprat en la pràctica clínica tant per a control de la infecció com per a la prevenció de la transmissió vertical (*Connor 1994*). Malgrat els avenços en el desenvolupament de nous medicaments ARV, la ZDV segueix figurant entre els fàrmacs de primera línia en el TAR de gestants infectades i segueix essent el fàrmac d'elecció via endovenosa en la gestant durant el part, i per via oral en la profilaxi neonatal (*Recomanacions espanyoles i americanes PTV*). Si bé no està exempta d'efectes secundaris, múltiples estudis avalen la seva seguretat durant la gestació i les primeres setmanes de vida. A banda, es tracta de l'únic fàrmac ARV autoritzat en els nadons prematurs (*Recomanacions espanyoles i americanes PTV*), ja que és l'únic del que es disposa de dades farmacocinètiques en aquesta població.

Si bé la càrrega d'efectes secundaris observats en els lactants ENI deriva en bona part de l'exposició a ARV durant l'embaràs, la utilització de TAR per part de la mare és, individualment, la mesura preventiva més eficaç en la TV del VIH, més que les aplicades en el període perinatal (tipus de part, profilaxi materna intrapart i profilaxi en el nou-nat).

El bon control de la infecció per VIH que s'assoleix amb els actuals règims de TAR permet inclús la concepció natural mitjançant relacions sexuals no protegides i el part per via vaginal, sense risc de transmissió sexual o vertical del VIH, respectivament (*Recomanacions espanyoles i americanes PTV*). En aquest context i en situacions de molt bon control de la infecció durant la gestació, alguns experts i algunes recomanacions oficials proposen avançar en la reducció de l'exposició farmacològica eliminant la perfusió de ZDV durant el treball de part i inclús escurçant la durada de la profilaxi neonatal amb ZDV a pautes de 7-10 dies (*Sollai 2015*).

A banda de la toxicitat en el metabolisme mitocondrial, un dels efectes secundaris dels fàrmacs ARV en el context de la PTV més reportats en la literatura és la toxicitat hematològica, atribuïda principalment a la ZDV i que consisteix principalment en una anèmia macrocítica, lleu i transitòria, que s'autolimita entorn als 3 mesos de vida (*Sperling 1998*)(*Le Chenadec 2003*)(*Bunders Acta Paediatrica 2005*)(*Fernandez Ibieta 2008*). Altres sèries cel·lulars hematològiques, com ara els neutròfils i limfòcits, també quedarien afectades, habitualment sense associar clínica i inclús de forma més perllongada en el

temps que l'hemoglobina (*European Collaborative Study 2004*)(*Bunders AIDS 2005*) (*Pacheco 2006*).

Aquesta càrrega d'efectes secundaris en pacients altrament sans ha conduït a revisions successives de les recomanacions oficials per a la PTV del VIH, que han tendit progressivament a disminuir l'exposició en el temps als fàrmacs ARV, sense disminuir-ne l'eficàcia però reduint-ne toxicitat. Així doncs, en el disseny del nostre estudi es va intentar comprovar l'efecte de la reducció de la durada de la profilaxi neonatal de 6 setmanes, com s'havia fet des de l'estudi PACTG 076 (*Sperling 1998*), a 4 setmanes, com proposaven algunes guies des de 2008 (*Ruiter 2008*).

En aquest context, els resultats del nostre estudi apunten principalment a que la durada de la profilaxi neonatal té poca repercussió en la toxicitat hematològica en els ENI, essent-ne el principal responsable el TAR matern i sobretot l'exposició prenatal a ZDV.

Varis estudis obtenen resultats congruents amb els nostres. Una gran cohort francesa observa menors nivells d'hemoglobina en els nadons exposats a ZDV, que a més són inversament proporcionals al temps d'exposició al fàrmac (*Le Chenadec 2003*). Aquests mateixos autors i altres treballs observen major repercussió en els paràmetres hematològics amb el tractament combinat matern (versus les monoteràpies), especialment pel que fa a l'afectació de la sèrie roja (*Mandelbrot 2001*)(*Le Chenadec 2003*)(*El Beitune 2006*)(*Feiterna- Sperling 2007*). En el nostre estudi, el 93% de les gestants van rebre TAR d'acord amb les recomanacions de PTV en aquell moment, pel que no és possible determinar el seu impacte en comparació al de la monoteràpia o a l'absència d'exposició a fàrmacs ARV durant la gestació. No obstant, l'absència de diferències en la gran part dels paràmetres hematològics estudiats suggereix que la toxicitat que observem és més atribuïble a l'ús de TAR combinat en la gestació que a la profilaxi neonatal.

En un estudi realitzat a Tailàndia que inclou exclusivament gestants que reben monoteràpia amb zidovudina, s'observa menor concentració d'hemoglobina al néixer en aquells ENI amb exposició més perllongada (*Briand 2010*). A les 6 setmanes de vida, els pacients que reben profilaxi amb ZDV durant més de 4 setmanes mostren un major descens en les xifres d'hemoglobina que el grup de pacients tractats durant < 4 setmanes (*Briand 2010*); per tant, en aquest estudi la durada de la profilaxi neonatal té més influència en la toxicitat hematològica que la que observem nosaltres. Tanmateix, cal tenir en compte que la duració mitjana de la profilaxi del grup de < 4 setmanes de ZDV és només de 3 dies, el que fa que sigui molt difícil comparar aquests resultats amb els nostres.

Posteriorment a la publicació del present treball, un estudi realitzat a Itàlia, que inclou gestants en TAR combinat i els seus fills, que reben 6 setmanes de profilaxi amb ZDV, observa al naixement menor hemoglobina i major VCM en els exposats a règims materns de TAR que contenen ZDV en comparació als que no en contenen. A les 4 setmanes de vida, s'observen en ambdós grups signes analítics de toxicitat en la sèrie vermella, però sense diferències en funció de l'exposició prenatal a ZDV. Aquests autors hipotetitzen que els lactants no exposats prenatalment a ZDV podrien ser més susceptibles a la toxicitat derivada de la profilaxi neonatal, mentre que en els exposats prenatalment a ZDV la profilaxi no implicaria un gran efecte additiu (*Baroncelli 2011*).

La ZDV té un efecte inhibidor en els precursors hematopoètics, essent-ne la línia eritroide (especialment la fetal) la més sensible (*Dainiak 1988*)(*Shah 1996*)(*Gribaldo 2000*)(*Lewis 2004*). Encara que la major reducció dels nivells d'hemoglobina en els nostres pacients exposats a ZDV es dona a les 2-3 setmanes, el menor VCM observat a les 6 i 12 setmanes en els pacients que finalitzen exposició a ZDV al mes de vida podria indicar una recuperació més precoç de la sèrie eritroide del moll d'òs. Els mecanismes bioquímics que condueixen a aquesta inhibició dels precursors hematopoètics probablement són múltiples, i entre ells hi ha la disfunció mitocondrial (*Hobbs 1992*)(*Lewis 2004*). Esmentem en aquest punt l'Article 5 d'aquesta tesi en el que s'ha analitzat la relació entre la funció mitocondrial i els paràmetres hematològics d'aquesta mateixa cohort de pacients: hem observat menor activitat del complex CIV de la cadena respiratòria mitocondrial en els pacients amb anèmia de grau ≥ 2 en la classificació de DAIDS (*DAIDS 2014*). Aquesta troballa dona suport a la hipòtesi que la disfunció mitocondrial explica al menys en part l'anèmia macrocítica que observem en ENI exposats a zidovudina.

ARTICLE 2:

Influence of new antiretrovirals on hematological toxicity in HIV-exposed uninfected infants.

Rovira N, Noguera-Julian A, Rives S, Berruero R, Lahoz R, Fortuny C.

European Journal of Pediatrics, en premsa

La toxicitat hematològica fou descrita en els lactants ENI des de la introducció dels fàrmacs ARV en les estratègies de PTV (*Sperling 1998*), principalment l'anèmia macrocítica, habitualment asimptomàtica i autolimitada als 3 mesos de vida. S'associa principalment a l'exposició a ZDV, ja sigui en el TAR matern o en la profilaxi neonatal (*Le Chenadec 2003*) (*Bunders Acta Ped 2005*) (*El Beitune 2006*)(*Feiterna-Sperling 2007*) (*Fernandez Ibieta 2008*) (*Baroncelli 2010*) (*Briand 2010*). S'ha descrit també afectació subtil d'altres línies cel.lulars, com els neutròfils i els limfòcits CD8+, també en relació a la intensitat del TAR, i els limfòcits CD4+, de forma proporcional al grau d'activitat de la infecció pel VIH en la mare. A diferència de l'anèmia, la resta d'alteracions semblen persistir durant més temps, inclús fins als 8 anys d'edat (*European Collaborative Study 2004*)(*Bunders AIDS 2005*)(*Pacheco 2006*)(*Kakkar 2014*).

Aquestes alteracions habitualment no associen manifestacions clíniques. L'anèmia molt rarament precisa transfusió o interrupció de la profilaxi en el nadó i les alteracions observades en neutròfils i limfòcits no semblen implicar una disfunció immunitària. S'ha detectat un augment d'infeccions per patògens encapsulats en el primer any de vida en lactants ENI, tant en països de baixa renda com en el nostre medi (*Marinda 2007*)(*Epalza 2010*)(*Singh 2011*)(*Slogrove 2012*)(*Taron-Brocard 2014*), que seria secundari a un defecte de la immunitat humoral, pel menor pas transplacentari d'IgGs maternes al fetus (*Taron-Brocard 2014*). De fet, s'ha demostrat que la producció d'anticossos específics després de la vacunació en pacients ENI és òptima (*Jones 2011*), el que suggereix que la immunitat cel.lular està preservada en aquests lactants.

La repercussió clínica de la toxicitat hematològica derivada dels fàrmacs ARV en ENI és tan infreqüent que la necessitat i la cronologia de la monitorització analítica d'aquests lactants són incertes. La major part d'experts recomanen determinar paràmetres hematològics (especialment Hb i recompte de neutròfils), coincidint amb les extraccions sanguínies que es realitzen per a descartar la transmissió vertical del VIH (*Recomanacions españolas PTV 2013*) (*Recomanacions americanes PTV 2015*).

L'objectiu d'aquest estudi era observar si existien diferències en la toxicitat hematològica secundària a la diferent exposició a ARV durant la gestació, derivada de l'evolució temporal dels règims de TAR administrats a les gestants. Malgrat que els criteris d'inclusió foren molt estrictes, amb la intenció d'homogeneïtzar al màxim els dos grups en estudi, l'evolució epidemiològica i terapèutica de l'epidèmia a Catalunya va provocar diferències entre els dos períodes analitzats. En primer lloc, el nombre de casos de gestants infectades pel VIH en el nostre medi ha disminuït progressivament en els darrers anys (*Ministerio de Sanidad 2015*) i, per a obtenir grups comparables, el període d'inclusió necessari en P2 va ser de 6 anys, en contraposició als 2 anys del P1. Segonament, les gestants infectades incloses en el P2 són amb més freqüència immigrants i contagiades per via sexual, en detriment del contagi parenteral associat a la co-infecció pel VHC que observàvem en el P1. Finalment, observem també diferències derivades de l'evolució de les pautes de PTV, que inclouen una disminució de la indicació de cesària electiva i l'escurçament de la profilaxi neonatal amb ZDV oral de 6 a 4 setmanes en el P2. L'evolució en el canvi de TAR matern al llarg del temps, tal i com es pretenia en el disseny de l'estudi, queda palesa en el descens de l'ús d'ITIANs de 1a generació (ddI, d4T) i l'aparició de fàrmacs amb menor càrrega d'efectes secundaris al P2 (ABC, TDF) (*Recomanacions españolas PTV 2013*) (*Recomanacions americanes PTV 2015*). A excepció de les diferències en el TAR matern, la resta de diferències observades entre el P1 i P2 han estat incloses en les anàlisis estadístiques multivariants.

En el nostre estudi, en què s'ha utilitzat la darrera definició dels graus de toxicitat de la Division of AIDS (*DAIDS 2014*), amb uns lindars més exigents per a la definició d'anèmia i neutropènia, les prevalences observades d'aquestes són menors que les descrites prèviament per altres autors, encara que els valors absoluts d'Hb i de neutròfils han estat similars (*Bunders Acta Paediatrica 2005*)(*Le Chenadec 2003*). Tres pacients van presentar anèmia o neutropènia greus (graus 3 o 4), però van romandre asimptomàtics i aquestes alteracions es van resoldre espontàniament en tots els casos.

No observem diferències significatives en comparar els pacients de P1 i P2 en quant a la prevalença d'anèmia i neutropènia tenint en compte la definició de la Division of AIDS, i tampoc en comparar les concentracions mitjanes d'hemoglobina, el recompte absolut de neutròfils ni cap altre variable hematològica. Cal destacar que la ZDV va ser àmpliament utilitzada en el TAR matern en els dos períodes (64% i 73% en P1 i P2, respectivament) i això podria explicar l'absència de diferències, ja que aquest ha estat el fàrmac que més s'ha relacionat amb la toxicitat hematològica. Així, s'ha objectivat una

major capacitat de la ZDV en comparació a altres ITIANs d'inhibir la replicació de precursors hematopoètics, essent la línia eritroide molt més sensible que la mieloide, sobretot en la vida fetal (*Dainiak 1988*)(*Shah 1996*)(*Gribaldo 2000*)(*Lewis 2004*).

Observem també una normalització més precoç del VCM dels pacients del P2 en comparació als del P1, que podria estar relacionada amb la diferent exposició a TAR durant la gestació, ja que la diferència es manté després de l'anàlisi multivariant. Estudis recents observen que l'exposició materna a TAR és la principal causa d'anèmia en lactants ENI (*Dryden-Peterson 2011*). Encara que aquestes troballes no són clínicament rellevants, sí suggereixen que els règims TAR actuals són menys tòxics que els anteriors, també per al lactant ENI.

En línia amb les troballes ja descrites en l'Article 1 d'aquesta Tesi Doctoral (*Lahoz 2010*), detectem de nou que la macrocitosi associada a ZDV es recupera abans en aquells lactants ENI que reben 4 setmanes de ZDV neonatal, en comparació als que en reben 6 setmanes.

Sorprenentment, els lactants nascuts de mares de raça negra presenten menors nivells de VCM, tot i trobar-se encara en rang de macrocitosi fins a les 12 setmanes de vida. Aquesta diferència s'observa fins als 6 mesos, normalitzant-se posteriorment. La ferropènia materna no diagnosticada (*Stevens 2013*) o la major prevalença de trets talassèmics en aquesta raça (*Lanzkowsky 2016*) podrien ser les causes subjacents a aquesta troballa. El no disposar de dades hematològiques maternes no permet corroborar aquestes hipòtesis.

Així doncs, aquest estudi ens permet concloure que les noves pautes de TAR administrades en les gestants infectades pel VIH tenen molt poc impacte en la toxicitat hematològica dels seus fills i que aquesta sembla estar relacionada sobretot amb l'exposició prenatal i neonatal a ZDV.

ARTICLE 3:

Mitochondrial disturbances in HIV pregnancies.

Morén C, Noguera-Julian A, Garrabou G, Rovira N, Catalán M, Bañó M, Guitart-Mampel M, Tobías E, Hernández S, Cardellach F, Miró, Fortuny C.

AIDS 2015, Volum 29: 5-12

En la era prèvia al TAR, es va constatar que la infecció pel VIH en la gestant implicava un augment del risc de prematuritat i de baix pes al néixer (*Leroy 1998*). A dia d'avui i en el nostre medi, és excepcional detectar gestants infectades a les que no s'hagi pogut instaurar les mesures preventives pertinents. L'administració de fàrmacs ARV durant la gestació, part i període neonatal ha permès reduir la taxa de TV per sota del 2%. Es consideren fàrmacs segurs en aquest context, encara que s'han relacionat amb esdeveniments adversos obstètrics (baix pes al néixer, prematuritat, malaltia hipertensiva de l'embaràs, etc) i pediàtrics (anèmia macrocítica, neutropènia, hiperlactacidèmia, etc...).

En el nostre estudi, el part preterme sembla ser més freqüent i el pes al néixer és significativament menor en les parelles mare-fill exposades al VIH i en tractament ARV, que en les parelles mare-fill controls. La revisió de grans cohorts de parelles mare-fill apunten a que el TAR iniciat abans de la gestació o en el primer trimestre d'aquesta implica un major risc de prematuritat i baix pes a néixer, sobretot quan inclou IPs. (*European Collaborative Study 2000*)(*Thorne 2004*)(*Grosch-Woerner 2008*)(*Watts 2013*). No observem tampoc diferències en la incidència de pre-eclàmpsia entre grups. Alguns autors observen un risc més elevat de malaltia hipertensiva en la gestant VIH positiva que en la població general, sobretot si s'ha iniciat TAR abans de la gestació (*Suy 2006*)(*Stankiewicz 2014*), mentre que la revisió de cohorts més grans i una meta-anàlisi al respecte no observen aquest risc (*Tuomala 2005*)(*Calvert 2013*). El disseny del nostre estudi, amb un baix nombre de parelles mare-fill incloses, no permet descriure l'evolució clínica de les gestacions amb VIH, essent aquest tipus de troballes més pròpies d'estudis epidemiològics de grans cohorts.

Encara que la toxicitat mitocondrial derivada de l'exposició *in utero* a ITIANs ha quedat ben demostrada en models animals (*Gerschenson 2004*)(*Divi 2010*), queda molt per conèixer sobre el seu impacte en l'espècie humana.

La toxicitat mitocondrial ha estat àmpliament descrita en la infecció pel VIH, per efecte directe del virus i per l'exposició a fàrmacs ARV, sobretot als ITIANs (*Ferri 2000*) (*Apostolova 2011*). En context obstètric, un estudi previ del nostre grup observa una

depleció d'ADNmt en oòcits de dones infectades pel VIH i en TAR, que podria afectar la seva fertilitat (Lopez 2008). La detecció d'aquesta alteració en cèl·lules mancades de receptor per a l'entrada de partícules virals indica que, almenys en aquest cas, la toxicitat està més relacionada amb els fàrmacs ARV que amb el virus. D'altra banda s'ha implicat la disfunció mitocondrial en els nounats amb pes anòmal al néixer, ja sigui en forma de macrosomia o de baix pes per l'edat gestacional (Gemma 2006). El present estudi intenta determinar si la disfunció mitocondrial es relaciona amb les troballes clíniques observades en la nostra cohort.

La massa mitocondrial no està alterada en les gestants infectades ni en els seus nadons. El genoma mitocondrial mostra una tendència a la depleció tant en mares infectades com en els seus nadons en relació amb els controls. Aquestes troballes estan en línia amb estudis previs que reporten depleció d'ADNmt en sang perifèrica materna (Aldrovandi 2009), en placentes de gestants infectades i tractades amb TAR (Gingelmaier 2009)(Shiramizu 2003)(Divi 2004), i en la sang perifèrica dels seus nadons (Aldrovandi 2009). Si bé en el cas de teixits materns les troballes pel que fa al metabolisme mitocondrial són força coincidents, en els nadons ENI existeixen estudis que obtenen resultats contradictoris, ja que observen un augment de l'ADNmt en CMSP (McComsey 2008)(Côté 2008)(Ross 2012). Diferències metodològiques en quant a l'aïllament de les CMSP, la descontaminació de plaquetes i la quantificació i expressió dels nivells d'ADNmt, així com la gran heterogeneïtat en el tamany mostral i en l'exposició acumulada a ARV en els diversos estudis podrien explicar aquestes diferències. Altres autors determinen nivells d'ADNmt en CMSP de sang de cordó umbilical. Mentre alguns reporten nivells menors d'ADNmt (Poirier 2003)(Shiramizu 2003)(Hernandez 2012), altres en detecten un augment (Côté 2008). A banda de les possibles diferències metodològiques ja comentades, l'elevada probabilitat de contaminació amb sang materna de la sang de cordó pot influir també en aquests resultats discordants.

En el nostre estudi, els nivells més baixos d'ADNmt es reflexen consecutivament a nivell transcripcional i funcional, reflectint una disfunció global de l'òrganul, amb nivells significativament menors d'ARNmt en nadons ENI i amb un descens significatiu de les activitats enzimàtiques de la CRM, quan les valorem de forma global. La transcripció de l'ADNmt a ARNmt en el contexte del metabolisme mitocondrial influenciat per la infecció pel VIH i el TAR ha estat poc estudiada. Côté i cols. observen també nivells menors d'ARNmt en nadons ENI que en els controls, al néixer i fins a les 6 setmanes de vida, tot i que la diferència només és estadísticament significativa al néixer (Côté 2008).

En el nostre estudi, tot i descriure una afectació significativa de l'activitat enzimàtica combinada (CII+III) i global (CI-CIII-CIV) de la CRM, l'activitat dels complexos aïllats no està alterada en casos respecte als controls. Aquests resultats són coherents amb estudis previs del nostre grup en pacients pediàtrics amb infecció pel VIH via vertical, en els que vam observar alteracions significatives a la funció enzimàtica global de la CRM, en absència de compromís identificable en cap complex concret (*Morén PIDJ 2011*). Els nostres resultats suggereixen la presència d'alteracions lleus en els complexos individuals que només es fan paleses en la mesura de la funció global de la CRM.

En el nostre estudi posterior (*Noguera-Julian 2015*), inclòs com a article número 4 d'aquesta tesi doctoral, es mesura l'ADNmt i l'activitat del CIV en pacients ENI de forma longitudinal a les 6 setmanes, 3, 6 i 12 mesos de vida, en comparació a controls sans. Igual que en el present estudi, l'ADNmt en els pacients ENI és menor que en els controls sans, sense diferències estadísticament significatives, i amb uns valors que es mantenen estables i no mostren cap tendència al llarg del temps. L'activitat del CIV és significativament menor en els lactants ENI en tots els talls temporals, amb tendència a normalitzar-se a l'any de vida. L'activitat CIV i l'ADNmt presenten una correlació inversa fins als 6 mesos de vida, fet que suggereix la presència de mecanismes compensadors, que consistirien en un augment relatiu de l'ADNmt per a compensar el dèficit funcional. En el present estudi no hem observat diferències en l'activitat aïllada del CIV, el que es podria explicar pel baix número de parelles mare-fill incloses. A la vegada, en l'estudi longitudinal (*Noguera-Julian 2015*) no es disposà de suficient mostra de CMSP per a determinar activitats combinades. Aquestes limitacions no ens permeten valorar adequadament les diferents troballes pel que fa a la funció de la CRM en lactants ENI.

Observem una correlació positiva i significativa entre els paràmetres de genètica mitocondrial i la funció binària de la CRM (CII+III) tant en les mares com en els nadons, tant en els casos com en els controls. Això reforça la idea de que hi ha un defecte genètic que afecta la funció mitocondrial i secundàriament la viabilitat cel.lular, sense que haguem detectat la presència dels mecanismes compensadors que suggereixen els resultats de l'estudi longitudinal (*Noguera-Julian 2015*). Deixant a part diferències metodològiques en quant a tamany mostral, temporalitat, exposició farmacològica i processament de mostres i dades entre els dos estudis, probablement no es pugui establir una comparació directa entre els possibles mecanismes compensadors a què estan sotmesos cadascun dels complexos enzimàtics de la CRM en relació a l'ADNmt. En aquest sentit, cal recordar que les tres subunitats metabòlicament més actives del CIV són codificades per l'ADNmt i que

el CII és de codificació exclusiva al genoma nuclear, pel que la seva síntesi no pot ser regulada per l'ADNmt.

No es disposa d'altres estudis que analitzin la funcionalitat de la CRM en pacients ENI. Les referències al respecte en adults i pacients pediàtrics infectats pel VIH, naïfs o en tractament, en un escenari clínic i metabòlic ben diferent, no permeten extrapolació directa de resultats als lactants ENI (*Miró CID 2004*)(*Morén PIDJ 2011*)(*Morén JAIDS 2012*)(*Morén 2013*). Caldrien doncs estudis de major tamany mostral i que incloguin una anàlisi exhaustiva de les activitats enzimàtiques de la CRM en els ENI per aclarir la interrelació entre els paràmetres genètics i funcionals en aquesta població.

La correlació positiva observada entre els paràmetres materns i fetals, tant a nivell genètic com funcional, suggereix que la toxicitat causada per TAR en el context de la infecció per VIH en gestacions humanes té, de forma global, un efecte similar en la mare i en el nadó. Alguns estudis previs analitzen el metabolisme mitocondrial de mostres de parelles mare-fill de gestacions amb infecció VIH, però molts d'ells utilitzen teixits materns com la placenta (*Ross 2012*) i sang de cordó com a mostra del nadó (*Divi 2004*)(*Divi 2007*)(*Hernandez 2012*), pel que les dades no són directament comparables. *Aldrovandi* i cols. quantifiquen també l'ADNmt en CMSP de les mares i els seus nadons al néixer, observant igualment una correlació positiva però dèbil (*Aldrovandi 2009*). En l'estudi d'*Hernandez* i cols., realitzat en gestants infectades pel VIH i els seus nadons nascuts en un altre centre, però amb estudis de metabolisme mitocondrial realitzats pel mateix laboratori de referència, s'obtenen dades similars al nostre, malgrat que la funció mitocondrial dels nadons es mesurà en sang de cordó (*Hernandez 2012*).

Encara que tant els esdeveniments materns i perinatals adversos com les alteracions mitocondrials en la mostra estudiada són més prevalents en les parelles mare-fill amb infecció pel VIH que en les parelles control, els nostres resultats no confirmen cap associació entre la disfunció mitocondrial i les manifestacions clíniques observades (prematuritat, baix pes al néixer). Caldrien estudis en cohorts més extenses per a confirmar o descartar aquesta potencial relació entre l'exposició a ARV, la toxicitat mitocondrial i la morbiditat en les gestants exposades al VIH i els seus nadons. El bon control de la infecció VIH i l'àmplia cobertura de TAR entre les mares incloses en el nostre estudi ens fan relacionar les troballes obtingudes sobretot amb l'exposició a TAR; no obstant podria haver-hi certa influència de l'acció inflamatòria del virus sobre els teixits fetals (*Aldrovandi 2009*) o fins i tot d'altres mecanismes patogènics encara no descrits.

ARTICLE 4:

Decreased mitochondrial function among healthy infants exposed to antiretrovirals during gestation, delivery and the neonatal period.

Noguera-Julian A, Morén C, Rovira N, Garrabou G, Catalán M, Sánchez E, Cardellach F, Miró Ò, Fortuny C.

The Pediatric Infectious Disease Journal 2015, Volum 34 (12): 1349-54

Aquest és el primer estudi que analitza el metabolisme mitocondrial dels lactants ENI de forma longitudinal, tant des del punt de vista genètic, mesurant el contingut d'ADNmt, com funcional, mitjançant l'activitat enzimàtica del CIV de la CRM. El CIV de la CRM està format per 13 subunitats: les proteïnes de les subunitats COX I, COX II i COX III estan codificades pel genoma mitocondrial i la resta pel genoma nuclear. Dos estudis previs (*Ross 2012*)(*McComsey 2008*) analitzen el metabolisme mitocondrial en nounats ENI, utilitzant la ràtio COXII/COXIV com a marcador indirecte de síntesi proteica mitocondria-depenent; els autors hipotetitzen que l'exposició perinatal a ARV disminuiria la replicació d'ADNmt i que això provocaria una síntesi deficient de les sub-unitats codificades per ADNmt. Tot i que ambdós treballs observen ràtios COXII/COXIV menors en lactants ENI en comparació a controls sans a les 48h de vida, aquestes diferències no mostren significació estadística.

En el nostre estudi, al determinar la funció del CIV per espectrofotometria, observem una menor activitat en els pacients ENI al comparar amb els controls de forma consistent en tots els talls temporals, amb una tendència significativa cap a la normalització a l'any de vida. Aquesta progressió en el temps és comparable a l'evolució dels nivells de lactat (de patològicament elevats cap a la normalització) que vam observar en aquesta mateixa cohort (*Noguera 2004*), malgrat que en el present estudi no observem correlació entre els nivells de lactat i l'activitat del CIV.

Tot i que els resultats obtinguts apunten a una disfunció en la CRM, cap dels pacients inclosos en l'estudi ha presentat signes clínics suggestius de malaltia mitocondrial, probablement degut a que les alteracions bioquímiques observades no assoleixen el llindar a partir del qual la disfunció mitocondrial és clínicament aparent (*DiMauro 2003*).

El fet que als 12 mesos de vida observem encara una menor activitat del CIV de la CRM en els ENI en comparació als controls sans manté l'interrogant sobre la durada d'aquesta disfunció i sobretot, sobre la seva potencial repercussió clínica a llarg termini. Les dues publicacions que alertaren sobre la presència de malaltia mitocondrial en ENI presentaven casos amb debut clínic mesos després de finalitzar l'exposició a fàrmacs ARV (*Blanche 1999*)(*Brogly 2007*) i, en molts dels pacients, més enllà de l'any de vida. En

aquesta línia, la majoria d'experts insisteixen en la necessitat de fer un seguiment a molt llarg termini dels pacients ENI, per la possibilitat de detectar disfuncions relacionades amb l'envelliment. Així, s'han observat signes de compromís mitocondrial progressiu en fetges i cervells de primats exposats *in utero* a ARV (Divi 2010), també subtils canvis en l'estructura cardíaca en nens ENI de 2 a 5 anys de vida (Lipshultz 2011)(Lipshultz 2015) i una major incidència de mutacions en l'ADNmt de gestants infectades pel VIH i en els seus nadons, de repercussió encara desconeguda (Jitratkosol 2012).

Pel que fa a nivells d'ADNmt, els nostres resultats no detecten diferències significatives entre ENI i controls sans, si bé els nivells semblen ser discretament menors en els ENI. Aquestes troballes podrien deure's al baix número de mostres incloses, especialment de pacients control. En la revisió de literatura, els estudis mostren dades contradictòries: alguns observen depleció (Poirier 2003)(Aldrovandi 2009) i altres augment (McComsey 2008)(Ross 2012) dels nivells d'ADNmt, en comparar-los amb controls sans. Aquesta divergència pot ser explicada per diferències metodològiques a diferents nivells. En primer lloc en l'aïllament de CMSP, en el que cal garantir una correcta descontaminació de plaquetes, ja que són elements sanguinis que contenen ADNmt però no ADN nuclear. Segonament, en la temporalitat de les mostres obtingudes, ja que probablement els mecanismes d'adaptació de l'organisme a la toxicitat farmacològica en el període neonatal (McComsey 2008) (Ross 2012) no siguin els mateixos que en els primers anys de vida (Poirier 2003), ni tampoc iguals als del període post-puberal (Aldrovandi 2009). Finalment, pot haver-hi també diferències en els procediments d'extracció i quantificació de l'ADNmt, l'expressió dels resultats, corregits o no per la massa mitocondrial, i també en la intensitat i la durada de l'exposició a ARV.

En el nostre estudi es fa una determinació longitudinal de l'ADNmt en el temps, el mètode emprat per a l'obtenció dels *pellets* de CMSP garanteix una correcta descontaminació de plaquetes i l'ADNmt s'expressa corregit per la massa mitocondrial, amb la intenció de reflectir de forma més correcta la concentració d'ADNmt en cada mitocòndria. No obstant, el nombre de controls dels que disposem de dades d'ADNmt és petit, ja que en cas de volums petits de CMSP, vam decidir prioritzar l'estudi de l'activitat enzimàtica del CIV per sobre de la quantificació d'ADNmt. Cal tenir present tots aquests detalls a l'hora d'interpretar els resultats que obtenim en quant a la concentració d'ADNmt en els pacients inclosos en el nostre estudi.

Pel que fa l'evolució temporal dels nivells d'ADNmt no observem tampoc cap tendència, més aviat objectivem uns nivells estables al llarg del temps d'estudi (0,009,

0,010, 0,008 i 0,010 de tND2/RPII ratio corregida per CS a les 6 setmanes, 3, 6 i 12 mesos, respectivament). *Aldrovandi* i cols., en estudiar una cohort de 411 ENI de 0 a 18 anys d'edat no observen tampoc canvis significatius en els nivells d'ADNmt en CMSP al llarg del temps. (*Aldrovandi 2009*).

Se sap que el VIH pot generar directament disfunció mitocondrial en pacients naïfs a tractament ARV (*Côte 2002*)(*Casula 2005*)(*Maagard HIV Med 2006*). En el cas concret dels ENI, l'efecte citopàtic directe del virus sobre el fetus-nadó no estaria contemplat, i s'assumeix que els responsables de la disfunció mitocondrial observada serien tant l'exposició fetal/neonatal a fàrmacs ARV, principalment els ITIANs, com possiblement altres factors amb capacitat d'afectar els teixits materns relacionats amb el desenvolupament del fetus, com la placenta i el cordó umbilical (*Mc Comsey 2008*) (*Divi, Leonard 2007*)(*Shiramizu 2003*)(*Divi 2004*)(*Gerschenson 2004*). Malgrat que es segueix investigant intensament el paper dels fàrmacs ARV en la disfunció mitocondrial observada en persones exposades a aquestes teràpies, estem davant d'un fenomen molt probablement multifactorial, en què les proteïnes virals i les citoquines inflamatòries generades per la infecció hi juguen també un paper (*Ferri 2000*).

Varis estudis suggereixen que un increment de l'ADNmt contrarestaria la toxicitat mitocondrial desencadenada per l'exposició a ARV en els lactants ENI. En aquest sentit, resulta de gran interès l'article d'*Aldrovandi* i cols ja que és l'únic que disposa de dades d'ADNmt de lactants exposats a VIH però no a ARV, que no s'utilitzaven encara en el moment en què algunes de les mostres foren recollides. En aquest estudi s'observa, en el període neonatal i fins als 5 anys de vida, un menor nivell d'ADNmt en tots els pacients exposats a VIH en comparació als controls sans, essent aquesta depleció inversament proporcional a l'exposició a fàrmacs ARV. Així, els pacients exposats a VIH però no a ARV tenen menors nivells d'ADNmt que els exposats a monoteràpia amb ZDV, i aquests últims, nivells menors que els exposats a TAR (*Aldrovandi 2009*). D'altra banda, els estudis que detecten un increment d'ADNmt en ENI inclouen principalment fills de mares en TAR durant la gestació (*McComsey 2008*)(*Ross 2012*), afavorint la hipòtesi que l'increment fos expressió d'aquest mecanisme de compensació. Aquestes troballes són congruents amb dades obtingudes en l'experimentació *in vitro* que demostren que alguns ITIANs (ZDV, 3TC, FTC i ABC) causen un augment del contingut d'ADNmt com a mecanisme de compensació davant de la toxicitat mitocondrial i l'estrès oxidatiu (*Lee 2000*) (*de Baar 2007*). D'altra banda, s'ha observat també que en una primera fase l'exposició a ZDV genera una resposta compensadora d'augment d'ADNmt, mentre que en fases més

avançades en desencadena una depleció, així com lesions en la morfologia mitocondrial (*Divi Haverkos 2007*).

La correlació inversa que observem entre el CIV i l'ADNmt fins als 6 mesos de vida en els lactants ENI també dóna suport a aquesta hipòtesi i és consistent amb les troballes de *Brogly* i cols., que observen nivells majors d'ADNmt en els pacients ENI que posteriorment desenvolupen clínica, quan els comparen amb els controls ENI asimptomàtics, i descriuen activitats menors dels CI i CIV de la CRM. En aquest treball, un cop instaurada la clínica compatible amb disfunció mitocondrial, la relació entre les activitats enzimàtiques i els nivells d'ADNmt s'inverteix i els pacients simptomàtics passen a tenir nivells menors d'ADNmt i majors activitats enzimàtiques que els controls ENI asimptomàtics. Tot i que aquestes diferències no assoleixen significació estadística, les tendències observades podrien suggerir que l'esgotament del mecanisme de compensació consistent en l'augment d'ADNmt podria conduir a l'aparició de clínica (*Brogly 2011*). Seria interessant ampliar aquests estudis incloent pacients exposats a VIH però sense exposició prenatal a ARV, però no es disposa de casos històrics suficients i, per raons ètiques òbvies, no és possible dissenyar estudis prospectius on es reclutin pacients d'aquestes característiques.

Finalment, en el nostre estudi observem nivells significativament menors d'ADNmt en aquells pacients amb exposició prenatal a ZDV, a tots els talls temporals. Els mecanismes de compensació en els primers mesos de vida de la funció mitocondrial, que com hem comentat, implicarien un augment relatiu de l'ADNmt, serien hipotèticament més potents en aquells pacients que comencen la seva exposició a ZDV en el període neonatal, en comparació amb els que porten setmanes d'exposició acumulada a ZDV *in utero* (*Lee 2000*)(*de Baar 2007*)(*Divi Haverkos 2007*).

Si bé el contingut d'ADNmt es manté estable durant tot el temps i sense diferències entre casos i controls, la massa mitocondrial sí es manté més gran en els ENI al llarg de tot el període d'estudi. Aquesta troballa dóna suport a la hipòtesi suggerida per altres autors que l'augment d'ADNmt estaria relacionat amb un augment del nombre de mitocòndries en CMSP, més que amb un increment de la replicació de l'ADNmt, tal i com s'havia suggerit anteriorment (*McComsey 2008*)(*Ross 2012*). Aquest fenomen també s'observa en els trastorns primaris de la cadena respiratòria mitocondrial, essent les acumulacions subsarcolèmiques de mitocòndries un criteri diagnòstic menor en pacients per sota dels 16 anys (*Bernier 2002*).

ARTICLE 5:

Mitochondrial dysfunction partially explains macrocytic anemia in HIV-exposed uninfected infants.

Rovira N, Noguera-Julian A, Morén C, Garrabou G, Lahoz R, Catalan M, Guitart M, Miró Ò, Fortuny C.

En valoració a la Revista AIDS Research and Therapy

La toxicitat hematològica, que afecta principalment la sèrie roja i els neutròfils, és l'efecte secundari més freqüent de l'exposició als ARV en els ENI. L'anèmia és macrocítica, s'autolimita en poques setmanes després de finalitzar l'exposició post-natal a ZDV i, malgrat que se n'han descrit esporàdicament formes greus (*Watson 1998*)(*Myers 2005*), habitualment és subclínica (*Sperling 1998*) (*Le Chenadec 2003*) (*Bunders Acta Ped 2005*) (*Fernandez Ibieta 2008*). D'altra banda, s'ha observat neutropènia lleu en pacients ENI en comparació a controls sans (*Le Chenadec 2003*)(*Bunders Acta Ped 2005*)(*Pacheco 2006*)(*Feiterna Sperling 2007*), sense repercussió clínica i de llarga durada, ja que podria persistir fins als 8 anys de vida (*European Collaborative Study 2004*). Ambdues alteracions es relacionen amb la durada i intensitat de l'exposició a ARV i no amb la situació clínica, immunològica o virològica de la mare (*Le Chenadec 2003*)(*Briand 2010*)(*El Beitune 2006*)(*Feiterna-Sperling 2007*)(*Baroncelli 2010*).

En el nostre estudi, els nivells d'Hb i els recomptes absoluts de neutròfils observats són molt similars als d'altres sèries (*Le Chenadec 2003*)(*Bunders Acta ped 2005*)(*Pacheco 2006*). Degut a la recent actualització dels graus de toxicitat de la Division of AIDS (*DAIDS 2014*), amb nivells de tall notablement superiors per a definir les categories d'anèmia i neutropènia que en les Guies prèvies (*DAIDS 2004*), les prevalences observades en la nostra sèrie són menors que les prèviament descrites per altres autors (25,8-53,8% de DAIDS major o igual a 2 anèmia o 14,6-48,0% de neutropènia) (*Feiterna-Sperling 2007*)(*Fernandez-Ibieta 2008*).

Pel que fa al metabolisme mitocondrial, s'han descrit nivells menors d'ADNmt, descens global de la funció de la CRM, i increment de l'apoptosi i de l'estrés oxidatiu en pacients pediàtrics infectats pel VIH i en TAR (*Morén 2013*), amb major intensitat en aquells que presentaven síndrome de lipodistròfia (*Morén PIDJ 2011*) i en aquells en tractament amb fàrmacs ARV de primera generació (*Saitoh 2007*)(*Morén JAIDS 2012*). Les alteracions mitocondrials també han estat observades en lactants ENI. Tal i com s'ha descrit i discutit àmpliament en l'Article 4 d'aquesta Tesi Doctoral (*Noguera-Julian 2015*),

hem observat menor activitat del CIV durant els primers 12 mesos de vida en pacients ENI en comparació a controls sans, sense diferències en els nivells d'ADNmt. A més, els nivells d'ADNmt presentaven correlació inversa amb l'activitat del CIV, suggerint la presència de mecanismes compensadors.

En aquest estudi ens plantejem si existeix una relació fisiopatològica entre els trastorns hematològics i la disfunció mitocondrial. A nivell cronològic, existeix certa discordança que suggereix que els mecanismes patogènics d'ambdós fenòmens són diferents. Com comentàvem, les xifres d'hemoglobina en els pacients ENI presenten uns nivells *nadir* a les 6 setmanes, normalitzant-se entorn dels 3 mesos de vida (*Sperling 1998*)(*Le Chenadec 2003*)(*Bunders Acta Ped 2005*). En canvi, els paràmetres mitocondrials, com el nivell de lactat plasmàtic (*Noguera 2004*) o l'activitat CIV/CS (*Noguera-Julian 2015*), es normalitzen de forma més progressiva al llarg del primer any de vida en els lactants ENI. A banda, els casos en què s'ha observat simptomatologia atribuïble a disfunció mitocondrial, sempre s'han esdevingut més enllà dels 12 mesos de vida (*Blanche 1999*). Tanmateix, aquesta aparent absència de coincidència temporal no descarta del tot que les toxicitats hematològica i mitocondrial estiguin relacionades.

Aquest és el primer estudi que analitza longitudinalment la relació entre toxicitat hematològica i marcadors de funció mitocondrial en una gran cohort de pacients ENI durant el primer any de vida. El resultat més destacable és l'observació d'una menor activitat CIV/CS en aquells lactants amb anèmia de grau DAIDS ≥ 2 a les 6 setmanes de vida. No es detecta associació entre toxicitat hematològica i exposició a cap ARV en concret ni tampoc amb cap altre paràmetre mitocondrial; tant en valors absoluts com en categories de toxicitat.

La ZDV té un potent efecte inhibidor de la replicació dels precursors hematopoïètics, sobretot dels de la sèrie eritroide (*Dainiak 1988*)(*Gribaldo 2000*) (*Lewis 2004*), que és dosi-dependenent i més intens durant la vida fetal (*Shah 1996*). En el cultiu *in vitro* de precursors hematopoïètics eritroïdes (*Hobbs 1992*) i pluripotencials (*Lewis 2004*) exposats a ZDV s'han observat troballes bioquímiques i genètiques compatibles amb disfunció mitocondrial: disminució de la ràtio ADNmt/ADNn i augment dels nivells de lactat, una disminució significativa de l'activitat de l'enzim àcid δ -aminolevulínic sintasa, crític per a la síntesi del grup hemo (*Lutton 1990*), i una sobreexpressió secundària del receptor de transferrina (*D'Alessandro 1999*) amb sobre càrrega cel·lular de ferro (*Pollack 1993*), simulant les anèmies sideroblàstiques (*Comaschella 2009*). En contrast amb això, altres

possibles mecanismes patogènics de la toxicitat hematològica podrien ser independents del metabolisme mitocondrial, com l'alteració de la síntesi de globines (Weidner 1990)(Spiga 1999), la disminució dels nivells de factors de transcripció involucrats en la diferenciació de les cèl·lules eritròides (Bridges 1996) (Spiga 1999) o una disminució de l'expressió del receptor de l'eritropoietina i els seu ARNm ZDV-dependent (Gogu 1992).

De forma similar a l' article 4 (Noguera-Julian 2015), observem nivells menors d'ADNmt als 3 i 6 mesos de vida en lactants ENI exposats a ZDV durant la gestació, fet que podria ser explicat, com ja s'ha comentat, per mecanismes compensatoris d'intensitat diferent en funció del temps d'exposició a ZDV. El fet de no detectar associació entre l'exposició a ZDV i la concentració d'hemoglobina ni el grau d'anèmia, suggereix que aquesta diferència temporal en la compensació de la toxicitat mitocondrial no estaria implicada en el desenvolupament d'anèmia ni en la síntesi d'hemoglobina.

Altres factors, a banda de l'exposició a fàrmacs ARV, podrien jugar cert paper en el desenvolupament d'anèmia en els lactants ENI, com ara la presència de coinfeccions víriques que poden passar clínicament inadvertides com el citomegalovirus, el consum de drogues d'abús o d'altres fàrmacs, o altres comorbilitats pròpies de l'època perinatal, com les isoimmunitzacions o les transfusions fetomaternes (Lanzkowsky 2016).

En el nostre estudi, els marcadors de metabolisme mitocondrial no s'associen a neutropènia ni a altres troballes en els recomptes de la resta de cèl·lules sanguínies. No existeixen estudis *in vitro* ni en lactants ENI en què s'hagi mesurat aquesta relació. Varis estudis han comunicat anomalies subtils i a llarg termini en els recomptes de neutròfils (Le Chenadec 2003)(European Collaborative Study 2004) i en les subpoblacions limfocitàries en lactants ENI, que s'associen a l'exposició a ARV en el cas de neutròfils i limfòcits CD8+ (Pacheco 2006), i al recompte de limfòcits CD4+ i a la càrrega viral materna, en el cas dels limfòcits CD4+ (Bunders AIDS 2005)(Kakkar 2014).

En resum, els nostres resultats suggereixen que la disfunció mitocondrial podria explicar parcialment l'anèmia macrocítica relacionada amb l'exposició a ZDV observada en lactants ENI. Molt probablement aquesta toxicitat és el resultat de l'addició de varis mecanismes patogènics associats a l'exposició a ZDV, però també amb altres variables relacionades o no amb la infecció VIH (ús matern i neonatal d'altres ARV, altres infeccions de TV, edat gestacional, pes al néixer, etc.).

VI. Conclusions

ARTICLE 1: ***Antiretroviral-related hematologic short-term toxicity in healthy infants. Implications of the new neonatal 4-week zidovudine regimen.***

Lahoz R, Noguera-Julian A, Rovira N, Català A, Sánchez E, Jiménez R, Fortuny C.

The Pediatric Infectious Disease Journal 2010, Volum 29 (4): 376-79.

Objectiu. Determinar si la reducció de la durada de la profilaxi neonatal amb zidovudina de 6 a 4 setmanes en el context de la PTV s'associa a una menor toxicitat hematològica en el primer any de vida en els pacients exposats a VIH no infectats.

- La durada de la profilaxi neonatal amb zidovudina en els ENI sembla tenir un efecte additiu però no primordial en la toxicitat hematològica observada. Escurçar la profilaxi a 4 setmanes no implica diferències en la incidència de toxicitat, però sí associa una resolució més precoç de la macrocitosi.

Objectiu. Determinar quins fàrmacs del TAR matern es relacionen amb la toxicitat hematològica observada.

- Els règims de TAR combinat en la gestant que contenen ZDV s'associen a menor concentració d'hemoglobina i a major incidència d'anèmia en els ENI.

ARTICLE 2:

Influence of new antiretrovirals on hematological toxicity in HIV-exposed uninfected infants.

Rovira N, Noguera-Julian A, Rives S, Berrueco R, Lahoz R, Fortuny C.

European Journal of Pediatrics, en premsa

Objectiu. Analitzar si els canvis en els règims TAR en les gestants amb infecció VIH al llarg del temps han tingut impacte en la toxicitat hematològica dels lactants ENI.

- Els nous règims de TAR administrats a les gestants infectades pel VIH tenen un impacte menor i clínicament no significatiu en la toxicitat hematològica observada en els seus fills, que sembla estar relacionada sobretot amb l'exposició gestacional i neonatal a ZDV.

ARTICLE 3: ***Mitochondrial disturbances in HIV pregnancies.***

Morén C, Noguera-Julian A, Garrabou G, Rovira N, Catalán M, Bañó M, Guitart-Mampel M, Tobías E, Hernández S, Cardellach F, Miró Ò, Fortuny C.

AIDS 2015, 29: 5-12

Objectiu: Descriure la funció mitocondrial en gestants infectades pel VIH i en tractament ARV i als seus fills ENI, tant a nivell genètic com funcional.

- En les parelles mare-fill amb infecció VIH i exposades al TAR, s'observen menors activitats enzimàtiques combinades (complexes CII+CIII i CI+CIII+CIV) tant en les mares com en els nadons, i nivells més baixos d'ARNmt només en els lactants. A nivell funcional i genètic, s'observa una correlació positiva entre la disfunció materna i la neonatal.

Objectiu: Determinar si els marcadors de funció mitocondrial es relacionen amb les variables maternes i perinatals.

- No es detecta relació entre la disfunció mitocondrial observada i els esdeveniments clínics adversos, ni en la gestant ni en el lactant ENI.

ARTICLE 4:

Decreased mitochondrial function among healthy infants exposed to antiretrovirals during gestation, delivery and the neonatal period.

Noguera-Julian A, Morén C, Rovira N, Garrabou G, Catalan M, Sánchez E, Cardellach F, Miró Ò, Fortuny C.

The Pediatric Infectious Disease Journal 2015, Volum 34 (12): 1349-54

Objectiu: Descriure la funció mitocondrial durant els primers 12 mesos de vida dels pacients ENI en termes de replicació genètica i funció enzimàtica de la cadena respiratòria mitocondrial.

- En els pacients ENI s'observa una disminució en l'activitat enzimàtica del CIV de la CRM que tendeix a la normalització al llarg del primer any de vida. No observem canvis significatius en els nivells d'ADNmt, que es mantenen estables al llarg del temps.

Objectiu: Determinar l'associació entre els nivells d'ADNmt, la funció enzimàtica i l'exposició a ARV durant l'embaràs i el període neonatal.

- L'activitat enzimàtica del CIV de la CRM es correlaciona negativament amb els nivells d'ADNmt fins als 6 mesos de vida. S'observen nivells menors d'ADNmt en pacients amb exposició prenatal a ZDV.

ARTICLE 5:

Mitochondrial dysfunction partially explains macrocytic anemia in HIV-exposed uninfected infants.

Rovira N, Noguera-Julian A, Morén C, Garrabou G, Lahoz R, Catalán M, Guitart M, Miró Ò, Fortuny C.

En valoració a la Revista AIDS Research and Therapy

Objectiu: Analitzar la relació entre les variables del metabolisme mitocondrial, genètiques i funcionals, i els valors hematològics durant el primer any de vida en lactants ENI.

- S'observa una menor activitat CIV/CS en aquells lactants ENI amb anèmia de grau DAIDS ≥ 2 a les 6 setmanes de vida. No es detecta associació entre la toxicitat hematològica i l'exposició a cap ARV en concret, ni tampoc amb cap altre paràmetre mitocondrial.

Bibliografia

- **Aldrovandi** GM, Chu C, Shearer WT, Li D et al. Antiretroviral exposure and lymphocyte mtDNA content among uninfected infants of HIV-1 infected women. *Pediatrics* 2009; 124(6):1189-97.
- **Alimenti** A, Burdge D, Ogilvie G, Money D et al. Lactic acidemia in human immunodeficiency virus-uninfected infants exposed to perinatal antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:782-8.
- **Alimenti** A, Forbes JC, Oberlander TF, Money D et al. A prospective controlled study of neurodevelopment in HIV-uninfected children exposed to combination antiretroviral drugs in pregnancy. *Pediatrics* 2006; 118(4):1139-46.
- **Allard** JP, Aghdassi E, Chau J et al. Effects of vitamin E and C supplementation on oxidative stress and viral load in HIV-infected subjects. *AIDS* 1998; 12(13):1653-9.
- **Andersen** O, Haugaard SB, Jørgensen LT et al. Preanalytical handling of samples for measurement of plasma lactate in HIV patients. *Scand J Clin Lab Invest* 2003; 63(6):449-54.
- **Andrés Schmutz** I, Dal-Cortivo L, Six E et al. Genotoxic signature in cord blood cells of newborns exposed in utero to Zidovudine-based antiretroviral combination. *J Infect Dis* 2013; 208(2):235-43.
- **Apostolova** N, BlasT García A, Esplugues JV. Mitochondrial interference by anti-HIV drugs: mechanisms beyond Pol-g inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences* 2011; 32(12):715-725.
- **Arnaudo** E, Dalakas M, Shanske S et al. Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy. *Lancet* 1991; 337(8740):508-10.
- **Barnhart** HX, Caldwell MB, Thomas P et al. Natural history of Human Immunodeficiency Virus disease in perinatally infected children: An analysis from the pediàtric spectrum of disease project. *Pediatrics* 1996; 97(5):710-716.
- **Baroncelli** S, Pinnetti C, Genovese O et al. Hematologic effects of zidovudine prophylaxis in newborn infants with and without prenatal exposure to zidovudine. *J Med Virol* 2011; 83:551-556.
- **Barré.Sinoussi** F, Chermann JC, Rey F et al. Isolation of a T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983 20;220(4599):868-71.
- **Barré Sinoussi** F, Ross AL, Delfrayssi JF. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11(12):877-83.
- **Barret** B, Tardieu M, Rustin P, Lacroix C et al for the French Perinatal Cohort Study Group. Persistent mitochondrial dysfunction in HIV 1 exposed but uninfected infants: clinical screening in a large prospective cohort. *AIDS* 2003; 17:1769–1785

- **Barrientos** A. In vivo and in organelle assessment of OXPHOS activities. *Methods* 2002; 26(4):307-16.
- **Benhammou** V, Warszawski J, Bellec S et al. Incidence of cancer in children perinatally exposed to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS* 2008;22(16):2165-77.
- **Bernier** FP, Boneh A, Denet X et al. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 2002; 59(9):1406-11.
- **Blanche** S, Mayaux MJ, Rouzioux CH et al. Relation of the course of HIV infection in children to the severity of the disease in their mothers at delivery. *The N Eng J Med* 1994; 330(5):308-312.
- **Blanche** S, Tardieu M, Rustin P, Slama A, Barret B et al. Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *Lancet* 1999; 354:1084-89.
- **Briand** N, Le Coeur S, Jourdain G, Hotrawarikarn S et al. for the Program for HIV Prevention and Treatment Study Group. Short communication: Hematological safety of perinatal exposure to zidovudine in uninfected infants born to HIV type 1 infected women in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010; 26(10): 1163-1166.
- **Bridges** EG, Trentesaux C, Lahlil R et al. 3'T azidoT 3'T deoxythymidine inhibits erythroid-specific transcription factors in human erythroid K562 leukemia cells. *Eur J Haematol* 1996; 56(1-2):62-67.
- **Brinkman** K, ter Hofstede HJ, Burger DM et al. Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS* 1998; 12(14):1735-44.
- **Brinkman** K. Editorial response: hyperlactatemia and hepatitis steatosis as features of mitochondrial toxicity of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *Clin Infect Dis* 2000; 31(1):167-9.
- **Brogly** S, Williams P, Seage GR 3rd et al. In utero nucleoside reverse transcriptase inhibitor exposure and cancer in HIV-uninfected children: an update from the pediatric AIDS clinical trials group 219 and 219c cohorts. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41(4): 535-6.
- **Brogly** S, Ylitalo N, Mofenson LM et al. In utero nucleoside reverse transcriptase inhibitor exposure and signs of possible mitochondrial dysfunction in HIV-uninfected children. *AIDS* 2007; 21(8)929-38.
- **Brogly** S, Foca M, Deville JG, Mirochnick M et al. Potential confounding of the association between exposure to nucleoside analogues and mitochondrial dysfunction in HIV-uninfected and indeterminate infant. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; 53(1):154-7.

- **Brogly S**, DiMauro S, Van Dyke RB, Williams PL et al. Short Communication: Transplacental nucleoside analogue exposure and mitochondrial parameters in HIV uninfected children. *AIDS Res and Hum Retroviruses* 2011; 27(7):777783.
- **Bulterys M**, Lepage P. Mother to child transmission of HIV. *Curr Opin Pediatr* 1998 10(2):143-50.
- **Bulterys M**, Nesheim S, Abrams EJ, Palumbo P et al for The Perinatal Safety Review Working Group. Lack of evidence of mitochondrial dysfunction in the offspring of HIV infected women. Retrospective review of perinatal exposure to antiretroviral drugs in the Perinatal AIDS Collaborative Transmission Study. *Ann N Y Acad Sci* 2000: 212 21.
- **Bunders M**, Thorne C, Newell ML for the European Collaborative Study. Maternal and infant factors and lymphocyte, CD4 and CD8 cell counts in uninfected children of HIV 1 infected mothers. *AIDS* 2005; 19:1071 1079.
- **Bunders MJ**, Bekker V, Scherpbier J et al. Haematological parameters of HIV 1 uninfected infants born to HIV 1 infected mothers. *Acta Paediatrica* 2005; 94:1571 1577.
- **Cade WT**, Waggoner AD, Hubert S et al. Reduced diastolic function and left ventricular mass in HIV negative preadolescent children exposed to antiretroviral therapy in utero. *AIDS* 2012; 26(16):2053-8.
- **Calvert C**, Ronsmans C. HIV and the risk of direct obstetric complications: a systematic review and meta analysis. *PLoS One* 2013;8(10):e74848.
- **Casademont J**, Barrientos A, Grau JM et al. The effect of zidovudine on skeletal muscle mtDNA in HIV 1 infected patients with mild or no muscle dysfunction. *Brain* 1996; 119(Pt4):1357-64.
- **Casula M**, Bosboom Dobbelaer I, Smolders K, Otto S et al. Infection with HIV 1 induces a decrease in mtDNA. *J Infect Dis* 2005; 191:1468–71.
- **Centers for Disease Control and Prevention**. 2104 Revised surveillance case definition for HIV Infection — United States, 2014. *MMWR* 2014; 63 (3):1-10.
- **Chattopadhyay K**, Aldous C. A brief review on human mtDNA mutations and NRTI associated mtDNA toxicity and mutations. *Mitochondrial DNA* 2014;11:1-3.
- **Chitnis S**, Mondal D, Agrawal KC. Zidovudine (AZT) treatment suppresses granulocyte monocyte colony stimulating factor receptro type alpha (GM CSFR α) gene expression in murine bone marrow cells. *Life Sci* 2002; 71:967-978.
- **Chouquet C**, Burgard M, Richardson S et al. Timing of mother to child HIV1 transmission and diagnosis of infection based on polymerase chain reaction in the neonatal period by a non parametric method. *AIDS* 1997; 11(9):1183-4.

- **Cianarello** AL, Seage GR 3rd, Freedberg KA et al. Antiretroviral drugs for preventing mother to child transmission of HIV in sub Saharan Africa: balancing efficacy and infant toxicity. *AIDS* 2008; 22(17):2359-69.
- **Cohen** MS, Hellmann N, Levy JA et al. The spread, treatment, and prevention of HIV 1: evolution of a global pandemic. *J Clin Invest* 2008;118:1244–1254.
- **Comaschella** C. Hereditary sideroblastic anemias: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Semin Hematol* 2009; 46:371-377.
- **Connor** EM, Sperling RS, Gelber R et al. Reduction of maternal infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* 1994; 331(18):1173-80.
- **Cooper** ER, Charurat M, Mofenson L et al. Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002 Apr 15;29(5):484-94.
- **Copeland** WC. Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Crit Rev in Biochem and Mol Biol*, 012; 7(1): 4–74.
- **Cossarrizza** A, Baccarani Contri M, Kalashnikova G et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J aggregate formin lipophilic cation 5,5',6,6' tetrachloro 1, 1', 3,3' tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 197 (1):40-5.
- **Cossarizza** A, Pinti M, Nasi M et al. Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA during HIV infection: a new role for mitochondrial damage associated molecular patterns during inflammation. *Mitochondrion* 2011; 11(5):750-5.
- **Côté** H, Brumme Z, Craib K, Math M et al. Changes in mitochondrial DNA as marker of nucleoside toxicity in HIV infected patients. *N Engl J Med* 2002;346:811-20.
- **Côté** H, Raboud J, Bitnun A, Alimenti A et al. Perinatal exposure to antiretroviral therapy is associated with increased blood mitochondrial DNA levels and decreased mitochondrial gene expression in infants. *Journal of Infectious Diseases* 2008; 198:851-59.
- **Creek** TL, Kim A, Lu L, Bowe A et al. Hospitalization and mortality among primarily nonbreastfed children during a large outbreak of diarrhea and malnutrition in Botswana, 2006. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010 Jan;53(1):14-9.
- **Culnane** M, Fowler M, Lee SS, McSherry G et al. Lack of long term effects of in utero exposure to zidovudine among uninfected children born to HIV infected women. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 219/076 Teams. *JAMA* 1999; 281(2):151-7.

- **D'Alessandro AM, D'Andrea G, Di Ciccio L, Brisdelli F, Rinaldi AC, Bozzi A, Oratore A.** 3'-azido-3'-deoxythymidine reduces the rate of transferrin receptor endocytosis in K562 cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1450(3):232-241.
- **DAIDS 2004:** Division of AIDS table for grading the severity of adult and pediatric adverse events. Publish date: december, 2004. Disponible a <http://www.niaid.nih.gov/labsandresources/resources/daidsclinrsrch/documents/daidsaegradingtable.pdf> Accés el 24 de març 2016.
- **DAIDS 2014:** Division of AIDS (DAIDS) Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events Version 2.0 November 2014. Disponible a http://rsc.techres.com/Document/safetyandpharmacovigilance/DAIDS_AE_Grading_Table_v2_NOV2014.pdf. Accés el 24 de març 2016.
- **Dainiak N, Worthington M, Riordan MA, Kreczko S, Goldman L.** 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) inhibits proliferation in vitro of human haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol* 1988; 69(3):299-304.
- **Dalakas M, Illa I, Pezeshkpour GH, Laukaitis P et al.** Mitochondrial myopathy caused by long term zidovudine therapy. *N Engl J Med* 1990; 322(16):1098-1105.
- **Davis RE, Williams M.** Mitochondrial function and dysfunction: an update. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 342(3):598-607.
- **De Baar MP, de Rooij ER, Smolders KG, van Schijndel HB, Timmermans EC, Bethell R.** Effects of apricitabine and other nucleoside reverse transcriptase inhibitors on replication of mitochondrial DNA in HepG2 cells. *Antivir Res* 2007;76(1):68-74.
- **De Martino M, Tovo A et al** for the Itallian Register for HIV Infection in Chidren. Features of children perinatally infected with HIV-1 surviving longer than 5 years. *Lancet* 1994; 343: 191-195.
- **De Ruiter A, Mercey D, Anderson J et al.** British HIV Association and CHildren's HIV Association guidelines for the management of HIV infection in pregnant women 2008. *HIV Med* 2008 ;9(7):452-502.
- **Desai N, Mathur M, Weedonb J.** Lactate levels in children with HIV/AIDS on highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2003, Vol 17(10):1565-1568
- **Di Mauro S, Schon EA.** Mitochondrial Respiratory Chain Diseases. *N Engl J Med* 2003;348:2656-68.
- **Divi R, Walker V, Wade N, Nagashima K et al.** Mitochondrial damage and DNA depletion in cord blood and umbilical cord from infants exponed in utero to Combivir. *AIDS* 2004; 18:1013-1021.

- **Divi R**, Haverkos K, Humsi H, Shockley ME, Thamire Ch et al. Morphological and molecular course of mitochondrial pathology in cultured human cells exposed long term to zidovudine. *Environ Mol Mutagen* 2007;48:179-189.
- **Divi RL**, Leonard SL, Kuo et al. Transplacentally exposed human and monkey newborn infants show similar evidence of nucleoside reverse transcriptase inhibitor induced mitochondrial toxicity. *Environ Mol Mutagen* 2007;48(3-4):201-9.
- **Divi RL**, Einem TL, Fletcher SL et al. Progressive mitochondrial compromise in brains and livers of primates exposed in utero to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). *Toxicol Sci* 2010; 118(1):191-201.
- **Dominguez K**, Bertolli J, Fowler M, Peters V et al for The Perinatal Safety Review Working Group. Lack of definitive severe mitochondrial signs and symptoms among deceased HIV uninfected and HIV indeterminate children ≤ 5 Years of Age, Pediatric Spectrum of HIV Disease Project (PSD), USA. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 236-246.
- **Dowell P**, Flexner C, Kwiterovich PO, Lane MD. Suppression of preadipocyte differentiation and promotion of adipocyte death by HIV protease inhibitors. *J Biol Chem* 2000 Dec 29;275(52):41325-32.
- **Drydens Peterson S**, Shapiro RL, Hughes MD et al. Increased risk of severe infant anemia after exposure to maternal HAART, Botswana. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011;56:428-436.
- **Dunn D**; HIV Paediatric Prognostic Markers Collaborative Study Group. Short term risk of disease progression in HIV 1 infected children receiving no antiretroviral therapy or zidovudine monotherapy: a meta analysis. *Lancet* 2003;362(9396):1605-11.
- **Eirís J**, Gómez C, Blanco MO, Castro Gago M: Enfermedades mitocondriales. Protocolos diagnóstico terapéuticos de Neuropediatría de la Asociación Española de Pediatría; 2008.
- **Ekouevi DK**, Touré R, Becquet R, Viho I et al for the Agence Nationale de Recherches Sur le SIDA 1201/1202 Ditrane Plus Study Group. Serum lactate levels in infants exposed peripartum to antiretroviral agents to prevent mother to child transmission of HIV: Agence Nationale des Recherches Sur le SIDA et les Hépatites Virales 1209 Study, Abidjan, Ivory Coast. *Pediatrics* 2006; 118(4):1071-77.
- **El Beitune P**, Duarte G. Antiretroviral agents during pregnancy: consequences on hematologic parameters in HIV exposed, uninfected newborn infant. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 128(1 2):59-63.
- **Epalza C**, Goetghebuer T, Hainaut M et al. High incidence of invasive group B streptococcal infections in HIV exposed uninfected infants. *Pediatrics* 2010; 126(3):e631-8.

- **European Collaborative Study.** Mother to child transmission of HIV infection. The European Collaborative Study. *Lancet* 1988;2(8619):1039-43.
- **European Collaborative Study.** Children born to women with HIV 1 infection: natural history and risk of transmission. European Collaborative Study. *Lancet* 1991;337(8736):253-60.
- **European Collaborative Study Group.** Natural history of vertically acquired human immunodeficiency virus-1 infection. The European Collaborative Study. *Pediatrics* 1994; 94 (6 Pt 1):815-9.
- **European Collaborative Study; Swiss Mother and Child HIV Cohort Study.** Combination antiretroviral therapy and duration of pregnancy. *AIDS* 2000; 14(18):2913-20.
- **European Collaborative Study.** Exposure to antiretroviral therapy in utero or early life: the health of uninfected children born to HIV infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003 32:380–387.
- **European Collaborative Study.** Levels and patterns of neutrophil cell counts over the first 8 years of life in children of HIV 1 infected mothers. *AIDS* 2004; 18: 2009-2017.
- **European Collaborative Study.** Mother to child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2005 Feb 1;40(3):458-65. Epub 2005 Jan 7.
- **Faraj A, Fowler DA, Bridges EG, Somadossi JP.** Effects of 2',3'dideoxynucleosides proliferation and differentiation of human pluripotent progenitors in liquid culture and their effects on mitochondrial DNA synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(5):924-930.
- **Feeney ER, Mallon PW.** Impact of mitochondrial toxicity of HIV 1 antiretroviral drugs on lipodystrophy and metabolic dysregulation. *Curr Pharm Des* 2010; 16 (30):3339-51.
- **Feiterna Sperling C, Weizsaecker K, Bühner C et al.** Hematologic effects of maternal antiretroviral therapy and transmission prophylaxis in HIV-1 exposed uninfected newborn infants. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 45(1):43-51.
- **Fernández M, Bellón JM, Ramos JT, González Tomé MI et al.** Exposición a antirretrovirales y toxicidad mitocondrial en una cohorte de niños no infectados hijos de madres VIH positivas. *Anales de pediatría* 2010; 73(4):180-188.
- **Fernandez Ibieta M, Ramos Amador JT, González Tomé MI, Guillén Martín S, Bellón Cano JM et al.** Anemia y neutropenia en una cohorte de niños no infectados hijos de madres positivas para el virus de la inmunodeficiencia humana. *An Pediatr (Barc)* 2008; 69(6):533-43.

- **Ferri** KF, Jacotot E, Blanco J, Esté JA, Kroemer G. Mitochondrial control of cell death induced by HIV-1 Mitochondrial control of cell death induced by HIV-1 encoded proteins. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;926:149-64.
- **Fischl** MA, Richman DD, Grieco MH et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 1987; 317(4):185-191.
- **Ford** N, Mofenson L, Shubber Z et al. Safety of efavirenz in the first trimester of pregnancy: an updated systematic review and meta-analysis. *AIDS* 2014; Suppl2:S123-31.
- **Foster** C, Lyall H. HIV and mitochondrial toxicity in children. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(1):8-12.
- **Garrabou** G, Morén C, López S et al. The effects of sepsis on mitochondria. *J Infect Dis* 2012; 205(3):392-400.
- **Gatell** JM, Clotet B, Podzamczar D, Miró JM, Mallolas J. Guía Práctica del SIDA. Clínica, diagnóstico y tratamiento 2015 (13ª Edición). Ed. Antares (Barcelona) 2015.
- **Gemma** C, Sookoian S, Alvariñas J et al. Mitochondrial DNA depletion in small and large for gestational age newborns. *Obesity* 2006; 14(12):2193-9.
- **Gerschenson** M, Nguyen V, Ewings EL et al. Mitochondrial toxicity in fetal Erythrocebus patas monkeys exposed transplacentally to zidovudine plus lamivudine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20(1):91-100.
- **Giaquinto** C, De Romeo A, Giacomet V, Rampon O et al. Lactic acid levels in children perinatally treated with antiretroviral agents to prevent HIV transmission. *AIDS* 2001; 15(8):1074-1075.
- **Gibb** D et al for the Pediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA). HIV-1 viral load and CD4 cell count in untreated children with vertically acquired asymptomatic or mild disease. *AIDS* 1998; 12:F1-F8.
- **Gibb** D M, Hughes M, Dunn D et al for HIV Paediatric Prognostic Markers Collaborative Study Group. Short term risk of disease progression in HIV-1 infected children receiving no antiretroviral therapy or zidovudine monotherapy: a meta-analysis. *Lancet* 2003; 362:1605-1611.
- **Gingelmaier** AA, Grubert T, Kost B, Setxer B et al. Mitochondrial toxicity in HIV type-1-exposed pregnancies in the era of highly active antiretroviral therapy. *Antiv Ther* 2009; 14:331-338.
- **Gogu** ASR, Malter JS, Agrawal KC. Zidovudine induced blockade of the expression and function of the erythropoietin receptor. *Biochem Pharmacol* 1992;44(6):1009-12.

- **Gribaldo L**, Malerba I, Collota A, Casati S, Pessina A. Inhibition CFU E/BFU E by 3'-azido-3'-deoxythymidine, chlorpropamide, and protoporphyrin IX Zinc (II): A comparison between direct exposure of progenitor cells and long term exposure of bone marrow cultures. *Toxicol Sci* 2000; 58:96-101.
- **Groschs Woerner I**; Puch K, Maier RF et al. Increased rate of prematurity associated with antenatal antiretroviral therapy in a German/Austrian cohort of HIV-1 infected women. *HIV Med* 2008; 9(1):6-13.
- **Guidelines on HIV and infant feeding**. Principles and recommendations for infant feeding in the context of HIV and a summary of evidence. WHO 2010. Disponible a http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599535_eng.pdf. Accés el 28 març 2016.
- **Hammer SM**, Squires KE, Hughes MD et al. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 1997; 337(11):725-33.
- **Hankin C**, Thorne C, Newell ML, European Collaborative Study. Does exposure to antiretroviral therapy affect growth in the first 18 months of life in uninfected children born to HIV-infected women? *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40(3):364-70.
- **Hart AB**, Samuels DC, Hulgán T. The Other Genome: A Systematic Review of Studies of Mitochondrial DNA Haplogroups and Outcomes of HIV Infection and Antiretroviral Therapy. *AIDS Rev* 2013; 15(4): 213-220.
- **Hart AM**, Wilson AD, Montovani C et al. Acetyl-l-carnitine: a pathogenesis based treatment for HIV associated antiretroviral toxic neuropathy. *AIDS* 2004; 18(11):1549-60.
- **Haugaard SB**, Andersen O, Pedersen SB et al. Depleted skeletal muscle mitochondrial DNA, hyperlactatemia, and decreased oxidative capacity in HIV infected patients on highly active antiretroviral therapy. *J Med Virol* 2005; 77(1):29-38.
- **Heidari S**, Mofenson L, Cotton MF, Marlink et al. Antiretroviral drugs for preventing mother-to-child transmission of HIV: a review of potential effects on HIV-exposed but uninfected children. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011;57:290-296.
- **Hernández S**, Morén C, López M et al. Perinatal outcomes, mitochondrial toxicity and apoptosis in HIV treated pregnant women and in-utero-exposed newborn. *AIDS* 2012; 26(4):419-28.
- **Hobbs GA**, Keilbaugh SA, Simpson MV. The friend murine erythroleukemia cell, a model system for studying the association between bone marrow toxicity induced by

3'-azido-3'-deoxythymidine and dideoxynucleoside inhibition of mtDNA replication. *Biochem Pharmacol* 1992; 43(7):1397-1400.

- **Imam T**, Jitratkosol MH, Soudeyns H et al. Leukocyte telomere length in HIV-infected pregnant women treated with antiretroviral drugs during pregnancy and their uninfected infants. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; 60(5):495-502.
- **Jafari A**, Khalili H, Dashti Khavidaki S. Tenofovir induced nephrotoxicity: incidence, mechanism, risk factors, prognosis and proposed agents for prevention. *Eur J Clin Pharmacol* 2014; 70(9):1029-40.
- **Jitratkosol MH**, Saththa B, Maan EJ et al. Blood mitochondrial DNA mutations in HIV-infected women and their infants exposed to HAART during pregnancy. *AIDS* 2012; 26(6):675-83.
- **John M**, Moore CB, James IR et al. Chronic hyperlactatemia in HIV-infected patients taking antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; 15(6):717-23.
- **Judd A**, Doerholt K, Tookey PA, Sharland M, et al. Morbidity, mortality, and response to treatment by children in the United Kingdom and Ireland with perinatally acquired HIV infection during 1996-2006: planning for teenage and adult care. *Clin Infect Dis*. 2007 Oct 1;45(7):918-24. Epub 2007 Aug 27.
- **Kafulafula G**, Hoover DR, Taha TE, Thigpen M, et al. Frequency of gastroenteritis and gastroenteritis-associated mortality with early weaning in HIV-1-uninfected children born to HIV-infected women in Malawi. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010 Jan;53(1):6-13.
- **Kakkar F**, Lamarre V, Ducruet T et al. Impact of maternal HIV 1 viremia on lymphocyte subsets among HIV-exposed uninfected infants: protective mechanism or immunodeficiency. *BMC Infect Dis* 2014; 14:236.
- **Kakuda TN**. Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor induced mitochondrial toxicity. *Clin Ther* 2000;22(6):685-708.
- **Kampira E**, Dzobo K, Kumwenda J et al. Peripheral blood mitochondrial DNA/nuclear DNA ratio as a marker of mitochondrial toxicities of stavudine containing antiretroviral therapy in HIV-infected Malawian patients. *OMICS* 2014; 18(7):438-45.
- **Karamchand L**, Dawood H, Chuturgoon AA. Lymphocyte mitochondrial depolarization and apoptosis in HIV 1-infected HAART patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;48:381-388
- **Knapp KM**, Brogly SB, Muenz DG et al. Prevalence of congenital anomalies in infants with in utero exposure to antiretrovirals. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31(2):164-70.
- **Koch MA**, Volberding PA, Lagakos SW, Booth DK, Pettinelli C, Myers MW. Toxic effects of zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infected

individuals with CD4+ cell counts of $0.50 \times 10^9/L$ or less. Detailed and updated results from protocol 019 of the AIDS Clinical Trials Group. *Arch Intern Med*.1992 Nov;152(11):2286-92.

- **Kohler** JJ, Lewis W. A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. *Environ Mol Mutag* 2007; 48(3-4):166-72.
- **Koopman** W, Willems P, Smeitink J. Monogenic Mitochondrial Disorders. *N Engl J Med* 2012;366:1132-41
- **Koopman** WJ, Willems PH, Smeitink JA. Monogenic mitochondrial disorders. *N Engl J Med* 2012; 366(12):1132-41.
- **Kourtis** AP, Schmid CH, Jamieson DJ et al. Use of antiretroviral therapy in pregnant HIV infected women and the risk of premature delivery: a meta analysis. *AIDS* 2007; 21(5):607-15.
- **Lahoz** R, Noguera Julian A, Rovira N et al. Antiretroviral-related hematologic short-term toxicity in healthy infants. Implications of the new neonatal 4-week zidovudine regimen. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2010, 29(4): 376-79
- **Landreau Mascaro** A, Barret B, Mayaux MJ, Tardieu M, Blanche S; French Perinatal Cohort StudyGroup. Risk of early febrile seizure with perinatal exposure to nucleoside analogues. *Lancet* 2002 Feb 16;359(9306):583-4.
- **Lanzkowsky** Ph, Lipton JM, Fish JD. Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology 2016 (6th Edition). Academic Press, Elsevier (UK, USA).
- **Le Chenadec** J, Mayaux MJ, Guihenneuc Joyaux CH, Blance S for Enquête Périnatale Française Study Group. Perinatal antiretroviral treatment and hematopoiesis in HIV-uninfected infants. *AIDS* 2003; 17:2053-2061.
- **Lee** HC, Yin PH, Lu CY Chi et al. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* 2000; 348: 425-432.
- **Leroy** V, Ladner J, Nyiraziraje M et al. Effect of HIV-1 infection on pregnancy outcome in women in Kigali, Rwanda, 1992-1994. Pregnancy and HIV Study Group. *AIDS* 1998; 12(6):643-50.
- **Lewis** LD, Amin S, Civin CI, Letman PS. Ex vivo zidovudine (AZT) treatment of CD34+ bone marrow progenitors causes decreased steady state mitochondrial DNA (mtDNA) and increased lactate production. *Hum Exp Toxicol* 2004; 23:173-185.
- **Lewis** W, Dalakas MC. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nat Med*. 1995 May;1(5):417-22.
- **Lim** S, Copeland WC. Differential incorporation and removal of antiviral deoxynucleotides by human DNA Polymerase γ . *J Biol Chem* 2001; 276(26):23616-23.

- **Lindegren** ML, Rhodes Ph, Gordon L, Fleming P et al for The Perinatal Safety Review Working Group. Drug safety during pregnancy and in infants. Lack of mortality related to mitochondrial dysfunction among perinatally HIV-exposed children in pediatric HIV surveillance. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 222-35.
- **Lipshultz** SE, Shearer WT, Thompson B et al. Cardiac effects of antiretroviral therapy in HIV-negative infants born to HIV-positive mothers: NHLBI CHAART-1 (National heart, lung and blood institute Cardiovascular status of HAART therapy in HIV-exposed infants and children cohort study). *J Am Coll Cardiol* 2011; 57(1):76-85.
- **Lipshultz** SE, Williams PL, Zeldow B et al. Cardiac effects of in-utero exposure to antiretroviral therapy in HIV uninfected children born to HIV infected mothers. *AIDS* 2015; 29(1):91-100.
- **Lopez** M, Figueras F, Hernandez S et al. Association of HIV infection with spontaneous and iatrogenic preterm delivery: effect of HAART. *AIDS* 2012; 26(1):37-43.
- **Lopez** O, Bonnefont Rousselot D, Edeas M et al. Could antioxidant supplementation reduce antiretroviral therapy induced chronic stable hyperlactatemia? *Biomed Pharmacother* 2003; 57(3-4):113-6.
- **López** S, Coll O, Durban M et al. Mitochondrial DNA depletion in oocytes of HIV-infected antiretroviral treated infertile women. *Antivir Ther* 2008; 13(6):833-8.
- **Lutton** JD, Mathew A, Levere RD, Abraham NG. Role of heme metabolism in AZT-induced bone marrow toxicity. *Am J Hematol* 1990; 35:1-5.
- **Maagaard** A, Holberg-Petersen M, Kolberg G, Oldfors et al. Mitochondrial (mt)DNA changes in tissue may not be reflected by depletion of mtDNA in peripheral blood mononuclear cells in HIV-infected patients. *Antivir Ther* 2006; 11: 601-608.
- **Maagaard** A, Holberg-Petersen M, Kvittingen EA, Sandvik L, Bruun JN. Depletion of mitochondrial DNA copies/cell in peripheral blood mononuclear cells in HIV-1-infected treatment naïve patients. *HIV Med* 2006 Jan;7(1):53-8.
- **Maagaard** A, Holberg-Petersen M, Løvgården G et al. Distinct mechanisms for mitochondrial DNA loss in T and B lymphocytes from HIV-infected patients exposed to nucleoside reverse transcriptase inhibitors and those naïve to antiretroviral treatment. *J Infect Dis* 2008; 198(10):1474-81.
- **Maagaard** A, Holberg-Petersen M, Løvgården G, Holm M et al. Distinct mechanisms for mitochondrial DNA loss in T and B lymphocytes from HIV infected patients exposed to nucleoside reverse transcriptase inhibitors and those naïve to antiretroviral treatment. *J Infect Dis* 2008; 198:1474-81.

- **Maagaard** A, Kvale D. Long term adverse effects related to nucleoside reverse transcriptase inhibitors: Clinical impact of mitochondrial toxicity. *Scand J Infect Dis* 2009; 41: 808-817.
- **Maagaard** A, Kvale D. Mitochondrial toxicity in HIV infected patients both off and on antiretroviral treatment: a continuum or distinct underlying mechanisms? *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(5):901-9.
- **Mandelbrot** L, Landreau.Mascaro A, Rekacewicz C et al. Lamivudine zidovudine combination for prevention of maternal infant transmission of HIV-1. *JAMA* 2001; 285(16):2083-93.
- **Marguli** L. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol* 1975; (29):21-38.
- **Marinda** E, Humphrey JH, Iliff PJ et al. Child mortality according to maternal and infant HIV status in Zimbabwe. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26(6):519-26.
- **Martin** AM, Hammond E, Nolan D et al. Accumulation of mitochondrial DNA mutations in human immunodeficiency virus infected patients treated with nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *Am J Hum Genet* 2003; 72(3):549-60.
- **Martin** F, Taylor GP. The safety of highly active antiretroviral therapy for the HIV positive pregnant mother and her baby: is 'the more the merrier'? *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(5):895-900.
- **McComsey** G, Paulsen DM, Lonergan JT et al. Improvements in lipoatrophy, mitochondrial DNA levels and fat apoptosis after replacing stavudine with abacavir or zidovudine. *AIDS* 2005; 19(1):15-23.
- **McComsey** G, Kang M, Ross AC, Lebrecht D et al. Increased mtDNA levels without change in mitochondrial enzymes in peripheral blood mononuclear cells of infants born to HIV-infected mothers on antirretroviral therapy. *HIV Clin Trials* 2008;9(2):126-136.
- **McGowan** JP, Shah SS. Prevention of perinatal HIV transmission during pregnancy. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(5):657-68.
- **Mortalidad VIH 2013**. Mortalidad por vih/sida en españa año 2013. Evolución 1981 2013 Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación. <http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/MortalidadXVIH2013.pdf>. Accés el 20 de març 2016
- **Ministerio de Sanidad 2015**: Vigilancia epidemiológica del VIH/SIDA en España. Actualitzación 30 de junio de 2015. Sistema de información sobre nuevos diagnósticos de VIH. Registro Nacional de casos de Sida. Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación. Sistemas autonómicos de vigilancia epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Noviembre 2015. Disponible a

https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/InformeVIH_SIDA_2015.pdf Accés el 20 de març 2016

- **Miró Ò**, Cardellach F, Barrientos A et al. Cytochrome c oxidase assay in minute amounts of human skeletal muscle using single wave length spectrophotometers. *J Neurosci Methods* 1998; 80(1):107-11.
- **Miró Ò**, López S, Pedrol E, Rodríguez Santiago B, Martínez E 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 Aug;8(4):333-8.
- **Miró Ò**, López S, Martínez E, Pedrol E et al. Mitochondrial effects of HIV infection on the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients who were never treated with antiretrovirals. *Clin Infect Dis* 2004; 39:710-6.
- **Miró Ò**, López S, Rodríguez de la Concepción M, Martínez E et al. Upregulatory mechanisms compensate for mitochondrial DNA depletion in asymptomatic individuals receiving stavudine plus didanosine. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;37:1550-1555.
- **Mirpuri J**, Jain L. Issues of prematurity and HIV infection. *Clin Perinatol* 2010 Dec; 37(4):887-905.
- **Miura T**, Goto M, Hosoya N et al. Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy. *J Med Virol* 2003;70(4):497-505.
- **Mofenson LM**, Korelitz J, Meyer WA et al The relationship between serum human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA level, CD4 lymphocyte percent, and long term mortality risk in HIV-1-infected children. *J Infect Dis* 1997; 175:1029-38.
- **Morén C**, Noguera Julian A, Rovira N, Corrales E et al. Mitochondrial impact of Human Immunodeficiency Virus and antiretrovirals on infected pediatric patients with or without lipodystrophy. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30(11): 992-995.
- **Morén C**, Noguera-Julian A, Rovira N, Garrabou G et al. Mitochondrial assessment in asymptomatic HIV-infected paediatric patients on HAART. *Antivir Ther* 2011; 16:719-24.
- **Morén C**, Noguera-Julian A, Garrabou G, Catalán M et al. Mitochondrial evolution in HIV infected children receiving first or second generation nucleoside analogues. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012;60:111-116.
- **Morén C**, Garrabou G, Noguera-Julian et al. Study of oxidative, enzymatic mitochondrial respiratory chain function and apoptosis in perinatally HIV-infected pediatric patients. *Drug Chem Toxicol* 2013; 36(4):496-500.
- **Morén C**, Noguera-Julian A, Garrabou G, Rovira N et al. Mitochondrial disturbances in HIV pregnancies. *AIDS* 2015, 29:5-12.

- **Mussini** C, Pinti M, Bugarini R, Borghi V, Nasi M et al. Effect of treatment interruption monitored by CD4 cell count on mitochondrial DNA content in HIV-infected patients: a prospective study. *AIDS* 2005 Oct 14;19(15):1627-33.
- **Myers** SA, Torrente S, Hinthorn D, Clark Pl. Life threatening maternal and fetal macrocytic anemia from antiretroviral therapy. *Obstet Gynecol* 2005; 106(5 Pt 2):1189-91.
- **Noguera** A, Fortuny C, Sanchez E, Artuch R et al. Hyperlactatemia in human immunodeficiency virus infected children receiving antiretroviral treatment. *Pediatr Infect Dis J.* 2003 Sep;22(9):778-82.
- **Noguera** A, Fortuny C, Muñoz Almagro C, Sanchez E et al. Hyperlactatemia in Human Immunodeficiency Virus uninfected infants who are exposed to antiretrovirals. *Pediatrics* 2004; 114(5): 598-603.
- **Noguera** A, Morén C, Rovira N, Sànchez E et al. Evolution of mitochondrial DNA content after planned interruption of HAART in HIV-infected pediatric patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010;26(9):1015-8.
- **Noguera-Julian** A, Morén C, Rovira N et al. Decreased mitochondrial function among healthy infants exposed to antiretrovirals during gestation, delivery and the neonatal period. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2015, 34 (12):1349-54.
- **Nolan** D, Hammond E, Martin A et al. Mitochondrial DNA depletion and morphologic changes in adipocytes associated with nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *AIDS* 2003. 17(9):1329-38.
- **Nunnari** J, Suomalainen A. Mitochondria: In Sickness an in Health. *Cell* 2012; 148:1145-1149.
- **O'Brien** SJ, Hedrickson SL. Host genòmic influences on HIV/AIDS. *Genome Biol* 2013; 14(1):201.
- **Onusida 2014**: World Health Organization: Global update on the health sector response to HIV, 2014. July 2014. Ref WHO/HIV/2014.15. Disponible a http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/128494/1/9789241507585_eng.pdf. Accés el 22 març 2016.
- **Onusida 2015**: World Health Organization: How AIDS changed everything — MDG6: 15 years, 15 lessons of hope from the AIDS response. Disponible a http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/MDG6Report_en.pdf. Accés el 20 de març 2016.

- **Pacheco** SE, McIntosh K, Lu M, Mofenson LM, et al. Effect of perinatal antiretroviral drug exposure on hematologic values in HIV-uninfected children: an analysis of The Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis* 2006; 194:1089-1097.
- **Palella** FJ, Delaney KM, Moorman AC et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; 338(13):853-60.
- **Palloti** F, Lenaz G. Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines. *Methods Cell Biol.* 2007;80-3 44.
- **Patel** K, Shapiro DE, Brogly SB et al. Prenatal protease inhibitor use and risk of preterm birth among HIV infected women initiating antiretroviral drugs during pregnancy. *J Infect Dis* 2010; 201(7):1035-44.
- **Pérez Matute** P, Pérez Martínez L, Blanco JR et al. Role of mitochondria in HIV infection and associated metabolic disorders: focus on non alcoholic fatty liver disease and lipodystrophy syndrome. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013:493413.
- **Poirier** M, Divi R, Al Harthi L, Olivero O et al. Long term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 33:175-183.
- **Pollack** S, Weaver J. Azidothymidine (AZT) induced siderosis. *Am J Hematol* 1993; 43:230-233.
- **Pollack** H, Glasberg H, Lee E et al. Impaired early growth of infants perinatally infected with human immunodeficiency virus: correlation with viral load. *J Pediatr* 1997; 130 (6): 915-922.
- **Prilutskii** AS, Khodakovskii AV, Mailian EA. A method of separating mononuclears on a density gradient. *Lab Delo* 1990;20-23.
- **Recomanacions espanyoles PTV 2013**: Grupo de expertos de la Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida (SPNS), Grupo de Estudio de Sida (GeSIDA)/Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) y Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP). Documento de consenso para el seguimiento de la infección por el VIH en relación con la reproducción, embarazo, parto y profilaxis de la transmisión vertical del niño expuesto. Disponible a <http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/publicaciones/profSanitarios/DocEmbarazoMarzo2013.pdf> Acces el 28 març 2016.
- **Recomanacions espanyoles pediatria 2015**: Panel de expertos de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP) y del Plan Nacional sobre el SIDA (PNS). Documento de consenso sobre tratamiento antirretroviral en niños y adolescentes con

infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (Enero 2016). Disponible a http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/publicaciones/profSanitarios/GuiasTAR_octubre2015completasFinal13_10_15.pdf. Accés el 25 de març de 2016.

- **Recomanacions Europees 2015:** Bamford A, Turkova A, Lyall H et al. Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) guidelines for treatment of paediatric HIV-1 infection 2015: optimizing health in preparation for adult life. *HIV Med* 2015. doi: 10.1111/hiv.12217. [Epub ahead of print]
- **Recomanacions americanes PTV 2015:** Panel on Treatment of HIV Infected Pregnant Women and Prevention of Perinatal Transmission. Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV 1 Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States. Disponible a <https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/perinatalgl.pdf>. Accés el 28 març 2016.
- **Recomanacions Americanes Pediatria 2016.** Panel on Antiretroviral Therapy and Medical Management of HIV Infected Children. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection. Updated March 2016. Disponible a <https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/pediatricguidelines.pdf> . Accés el 20 març 2016.
- **Recomanacions espanyoles adults 2016:** Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización enero 2016) Panel de expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida. Disponible a http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/publicaciones/profSanitarios/RecomendacionesTARGesidaPNS_enero2016.pdf. Accés el 21 de març 2016.
- **Richman DD, Fischl MA, Grieco MH, et al.** The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double blind, placebo controlled trial. *N Engl J Med.* 1987;317(4):192-7.
- **Ross AC, Leong T, Avery A, Castillo Duran M et al.** Effects of in utero antiretroviral exposure on mitochondrial DNA levels, mitochondrial function and oxidative stress. *HIV Medicine* 2012; 13:98-106.
- **Rovira N, Noguera-Julian A, Rives S et al.** Influence of new antiretrovirals on hematological toxicity in HIV exposed uninfected infants. *European Journal of Pediatrics*, en premsa.

- **Rovira** N, Noguera-Julian A, Morén C et al. Mitochondrial dysfunction partially explains macrocytic anemia in HIV-exposed uninfected infants. En valoració a *AIDS Research and Therapy*.
- **Rozioux** C, Costagliola D, Burgard M et al. Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission by use of a Morkov model. The HIV infection in Newborns French Collaborative Study Group. *Am J Epidemiol* 1995; 142 (12):1330-7.
- **Saitoh** A, Hull AD, Franklin P, Spector SA. Myelomeningocele in an infant with intrauterine exposure to efavirenz. *J Perinatol* 2005; 25(8):555-6.
- **Saitoh** A, Fenton T, Alvero C, Fletcher C, Spector SA. Impact of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on mitochondria in Human Immunodeficiency Virus type 1-infected children receiving highly active antiretroviral therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 1(12):4236.
- **Scaglia** F, Towbin JA, Craigen WJ, Belmont JW et al. Clinical Spectrum, Morbidity, and Mortality in 113 Pediatric Patients With Mitochondrial Disease. *Pediatrics* 2004; 114; 925-931.
- **Scalfaro** P, Chesaux JJ, Buchwalder PA, Biollaz J, Micheli JL. Severe transient neonatal lactic acidosis during prophylactic zidovudine treatment. *Intensive Care Med* (1998) 24: 247-250.
- **Scheffler** IE. Mitochondria. Second edition, 2010. Editorial Wiley Liss. ISBN 987047040737
- **Shah** MM, Li Y, Christensen RD. Effects of perinatal zidovudine on hematopoiesis: a comparison of effects on progenitors from human fetuses versus mothers. *AIDS* 1996; 10:1239-1247.
- **Shapira** AH. Mitochondrial diseases. *Lancet* 2012; 379(9828):1825-34.
- **Shapiro** RL, Hughes MD, Ogburn A, Kitch D et al. Antiretroviral regimens in pregnancy and breast feeding in Botswana. *N Engl J Med* 2010; 362(24): 2282-2294.
- **Shiramizu** B, Shikuma KM, Kamemoto L, Gerschenson M et al. Placenta and cord blood mitochondrial DNA toxicity in HIV infected women receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitors during pregnancy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 32:370-374.
- **Sibiude** J, Warszawski J, Tubiana R et al. Premature delivery in HIV-infected women starting protease inhibitor therapy during pregnancy: role of the ritonavir boost? *Clin Infect Dis* 2012; 54(9):1348-60.

- **Singh** G, Pai RS. Dawn of antioxidants and immune modulators to stop HIV progression and boost the immune system in HIV/AIDS patients: an updated comprehensive and critical review. *Pharmacol Rep* 2015; 67(3):600-5.
- **Singh** HK, Gupte N, Kinikar A et al. High rates of all cause and gastroenteritis related hospitalization morbidity and mortality among HIV-exposed Indian infants. *BMC Infect Dis* 2011; 11:193.
- **Sloand** E. Hematologic complications of HIV infection. *AIDS Rev.* 2005 Oct Dec;7(4):187-96.
- **Slogrove** A, Reikie B, Naidoo S et al. HIV exposed uninfected infants are at increased risk for severe infections in the first year of life. *J Trop Pediatr* 2012;58(6):505-8.
- **Sollai** S, Noguera-Julian A, Galli L et al. Strategies for the prevention of mother-to-child transmission in Western countries: an update. *Pediatr Infect Dis J* 2015; 35 (5 Suppl 1):S14-30.
- **Sommadossi** JP, Carlisle R. Toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)-guanine for normal human hematopoietic progenitor cells in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31(3):452-4.
- **Sperling** RS, Shapiro DE, McSherry GD, Britto P, Cunningham BE, Culnane M et al. Safety of the maternal infant zidovudine regimen utilized in the Pediatric AIDS Clinical Trial Group 076 Study. *AIDS* 1998 Oct 1;12(14):1805-13.
- **Spiga** MG, Weidner A, Trentesaux Ch, LeBoeuf RD, JP. Inhibition of β globin gene expression by 3'-azido-3'-deoxythymidine in human erythroid progenitor cells. *Antiviral Res* 1999; 44:167-177.
- **Stankiewicz Machado** ES, Krauss MR, Megazzini K et al. Hypertension, preeclampsia and eclampsia among HIV-infected pregnant women from Latin America and Caribbean countries. *J Infect* 2014;68(6):572-80.
- **Sternfeld** T, Schmid M, Tischleder A, Mudra S et al. The influence of HIV infection and antiretroviral therapy on the mitochondrial membrane potential of peripheral mononuclear cells. *Antiv Ther* 2007;12(5):769-78.
- **Stevens** GA, Finucane MM, De Regil LM et al. Nutrition Impact Model Study Group (Anemia). Global, regional, and national trends in haemoglobin concentration and prevalence of total and severe anemia in children and pregnant and non pregnant women for 1995-2011: a systematic analysis of population representative data. *Lancet Glob Health* 2013; 1:e16-e25.
- **Sullivan** PS, Hanson DL, Chu SY, Jones JL, et al. Epidemiology of anemia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected persons: results from the multistate adult and adolescent spectrum of HIV disease surveillance project. *Blood.* 1998;91(1):301-8.

- **Suy A, Martínez E, Coll O, Lonca M et al.** Increased risk of pre-eclampsia and fetal death in HIV infected pregnant women receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2006;20(1):59-66.
- **Taron-Brocard C, Le Chenadec J, Faye A et al.** Increased risk of serious bacterial infections due to maternal immunosuppression in HIV-exposed uninfected infants in a European country. *Clin Infect Dis* 2014; 59(9):1332-45.
- **The Kesho Bora Study Group.** Triple antiretroviral compared with zidovudine and single dose nevirapine prophylaxis during pregnancy and breastfeeding for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 (Kesho Bora study): a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 171-80.
- **Thorne C, Patel D, Newell ML.** Increased risk of adverse pregnancy outcomes in HIV-infected women treated with highly active antiretroviral therapy in Europe. *AIDS* 2004;18(17):2337-9.
- **Tovo A, de Martino M, Gabiano C et al.** Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV-1 infection. *Lancet* 1992; 339:1249-1253.
- **Tovo PA, Chiapello N, Gabiano C, Zegiani M, Spada M.** Zidovudine administration during pregnancy and mitochondrial disease in the offspring. *Antivir Ther.* 2005;10(6):697-9.
- **Townsend CL, Cortina Borja M, Peckham CS et al.** Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000-2006. *AIDS* 2008; 22(8)973-81.
- **Townsend CL, Byrne L, Cortina Borja M et al.** Earlier initiation of ART and further decline in mother-to-child HIV transmission rates, 2000-2011. *AIDS* 2014; 28(7):1049-57.
- **Tuomala RE, Watts DH, Li D et al.** Improved obstetric outcomes and few maternal toxicities are associated with antiretroviral therapy, including highly active antiretroviral therapy during pregnancy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 38(4):449-73.
- **Urata M, Koga Wada Y, Kayamori Y, Kang D et al.** Platelet contamination causes large variation as well as overestimation of mitochondrial DNA content of peripheral blood mononuclear cells. *Ann Clin Biochem.* 2008 Sep;45(Pt 5):513-4.
- **Van Dyke RB.** Mother-to-child transmission of HIV-1 in the era prior to the availability of combination antiretroviral therapy: the role of drugs of abuse. *Life Sci* 2011 May 23;88(21-22):922-5.
- **Vidricaire G, Tremblay MJ.** For a better understanding of the mechanisms involved in vertical transmission of HIV. *Med Sci (Paris)* 2004; 20(8-9):784-7.

- **Volverding** PA, Baker KR, Levine AM. Human immunodeficiency virus hematology. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:294-313.
- **Wainberg** MA, Kuan Teh J. 25 years of HIV-1 research – progress and perspectives. *BMC Medicine* 2008, 6:31-37.
- **Wanchu** A, Rana SV, Pallikkuth S et al. Short communication: oxidative stress in HIV infected individuals: cross sectional study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; 25(12):1307-11.
- **Watson** WJ, Stevens TP, Weinberg GA. Profound anemia in newborn infant of a mother receiving antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17(5):435-436.
- **Watts** DH, Huang S, Culnane M et al. Birth defects among a cohort of infants born to HIV-infected women on antiretroviral medication. *J Perinat Med* 2011; 39(2):163-70.
- **Watts** DH, Williams PL, Kacanek D et al. Combination antiretroviral use and preterm birth. *J Infect Dis* 2013; 07(4):612-21.
- **Weidner** DA, Somadossi JP. 3'-azido-3'-deoxythymidine inhibits globin gene transcription in butyric acid induced K-562 human leukemia cells. *Mol Pharmacol* 1990; 38:797-804.
- **Weiss** RA. Special Anniversary Review: Twenty five years of human immunodeficiency virus research: successes and challenges. *Clinical and Experimental Immunology* 2008; 152: 201–210
- **Williams** PL, Marino M, Malee K, Brogly S et al. Neurodevelopment and in utero antiretroviral exposure of HIV-exposed uninfected infants. *Pediatrics* 2010; 125(2): e250–e260
- **Wogan** GN. Does perinatal antiretroviral therapy create an iatrogenic cancer risk? *Environ Mol Mutagen* 2007; 48(3 4):210-14.
- **Xue** SY, Hebert VY, Hayes DM et al. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors induce a mitophagy associated endothelial cytotoxicity that is reversed by coenzyme Q10 cotreatment. *Toxicol Sci* 2013; 134(2):323-34.
- **Youle** M, Osio M, ALCAR study group. A double blind, parallel-group, placebo-controlled, multicentre study of acetyl-L-carnitine in the symptomatic treatment of antiretroviral toxic neuropathy in patients with HIV-1 infection. *HIV Med* 2007; 8(4):241-50.

Annexes

Annexe 1:

Annexe 1a: Estadis de la infecció pel VIH

(Centers for Disease Control and Prevention 2014).

Estadis¹ d'infecció pel VIH basada en recompte absolut o percentatge de limfocits CD4+ segons edat

Estadi	Edat					
	1 any		1-5 anys		≥ 6 anys	
	Cèl.lules/ μ L	%	Cèl.lules/ μ L	%	Cèl.lules/ μ L	%
1	≥ 1.500	≥ 34	≥ 1.000	≥ 30	≥ 500	≥ 26
2	750-1.499	26-33	500-999	22-29	200-499	14-25
3	< 750	< 26	< 500	< 22	< 200	< 14

L'estadi¹ es basa inicialment en el recompte de limfòcits T CD4+; el recompte absolut de CD4+ té més pes que el percentatge de limfòcits T CD4+, el percentatge es té en compte només si no es disposa de recompte absolut. En tres situacions l'estadi no es basa en aquesta taula: 1) si compleix criteris d'estadi 0, l'estadi és 0 independentment dels criteris per altres estadis; 2) si no compleix criteris per estadi 0 i presenta una infecció oportunista definitiva d'estadi 3, l'estadi és 3 independentment del recompte i percentatge de limfòcits T CD4+; 3) si no compleix criteris per estadi 0 i no es disposa d'informació per als criteris de la taula, l'estadi es considera desconegut.

Estadi 0:

- Resultats de laboratori discordants, suggestius d'infecció pel VIH recent; en què un test positiu està precedit per un test negatiu o indeterminat els 180 dies anteriors. Els criteris d'estadi 0 reemplacen i són independents dels criteris usats en la resta d'estadis.

Infecions oportunistes definitòries d'estadi 3 en infecció pel VIH.

- Infecions bacterianes, múltiples o recurrents¹.
- Candidiasi a bronquis, tràquea o pulmons.
- Candidiasi esofàgica.
- Càncer cervical invasiu².
- Coccidiomicosi disseminada o extrapulmonar.
- Criptococcosi extrapulmonar.
- Criptosporidiasi intestinal crònica (durada > 1 mes).
- Malaltia per *Citomegalovirus* (excepte a fetge, melsa o ganglis) d'inici en edat > 1 mes.
- Coriorretinitis per *Citomegalovirus* (amb pèrdua de visió).
- Encefalopatia per VIH.
- *Virus Herpes Simplex*: úlceres cròniques (durada > 1 mes) o bronquitis, pneumonitis o esofagitis (inici a edat > 1 mes).
- Histoplasmosi disseminada o extrapulmonar.
- Isosporidiasi intestinal crònica (durada > 1 mes)
- Sarcoma de Kaposi
- Limfoma de Burkitt.
- Limfoma immunoblàstic.
- Limfoma primari de sistema nerviós central.

- Infecció per *Mycobacterium avium* complex o *Mycobacterium kansasii* disseminada o extrapulmonar.
- Malaltia per *Mycobacterium tuberculosis* de qualsevol localització, pulmonar, disseminada o extrapulmonar.
- Infecció per micobacteries, altres espècies o espècies no identificades, disseminades o extrapulmonars.
- Pneumonia per *Pneumocystis jirovecii*.
- Pneumonia recurrent².
- Leucoencefalopatia multifocal progressiva.
- Sepsis recurrent per *Salmonella*
- Toxoplasmosi cerebral (inici a edat > 1 mes)
- Síndrome d'emaciació secundari a VIH

¹Només en nens d'edat < 6 anys.

²Només en adults, adolescents i nens d'edat ≥ 6 anys.

Annexe 1b: Manifestacions de la infecció per VIH (Recomanacions Americanes 2016)

A) Simptomatologia lleu secundària al VIH: Nens amb dues o més dels següents i sense símptomes moderats.

- Linfadenopaties ($\geq 0,5$ cm a més de dues localitzacions, bilaterals en una regió).
- Hepatomegàlia
- Esplenomegàlia
- Dermatitis
- Parotiditis
- Infeccions respiratòries de via alta recurrents o persistents, sinusitis o otitis mitja.

B) Simptomatologia moderada secundària al VIH:

- Anèmia (hemoglobina < 8 mg/dL), neutropènia (recompte absolut de neutròfils $< 1.0 \times 10^9/L$) i/o trombocitopènia (plaquetes $< 100 \times 10^9/L$) durant ≥ 30 dies.
- Meningitis bacteriana, sepsis o pneumònia (un únic episodi)
- Muguet que persisteix més de 2 mesos en nadons de menys de 6 mesos de vida.
- Cardiomiopatia.
- Infecció per CMV després del 1r mes de vida.
- Diarrea recurrent o crònica.
- Hepatitis.
- Estomatitis per virus herpes símplex recurrent (> 2 episodis/any).
- Bronquitis, pneumonitis o esofagitis per Virus herpes simple d'inici abans del mes de vida.
- Herpes zòster: 2 o més episodis o afectació demés d'un dermatoma.
- Liomiosarcoma.
- Pneumonia intersticial limfoide o complex hiperplàsia limfoide pulmonar.
- Nefropatia.
- Nocardiosi.
- Febre persistent > 1 mes de durada.
- Toxoplasmosi d'inici abans del mes de vida.
- Varicel·la disseminada.

Annexe 2: Principals efectes secundaris dels fàrmacs ARV

A2.1: ITIANs

ITIANs	<ul style="list-style-type: none"> - Acidosi làctica - Síndrome de lipodistròfia - Esteatosi hepàtica
Zidovudina	<ul style="list-style-type: none"> - Neutropènia - Anèmia macrocítica - Nàusees i vòmits - Cefalea - Miopatia - Pigmentació ungueal
Didanosina	<ul style="list-style-type: none"> - Pancreatitis - Neuropatia perifèrica - Alteracions electrolítiques - Diarrea, nàusees i vòmits - Resistència a insulina, diabetis mellitus - Hipertensió portal sense cirrosi - Alteracions retina, neuritis òptica.
Estavudina	<ul style="list-style-type: none"> - Neuropatia perifèrica - Pancreatiits - Resistència a la insulina, Diabetis mellitus - Síndrome de debilitat neuromuscular (similar a Guillain Barré) - Osteopenia - Hiperlipèmia
Lamivudina	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicitat mínima
Abacavir	<ul style="list-style-type: none"> - Reaccions d'hipersensibilitat en pacients HLA B057-01 positius - Possible augment del risc d'infart agut de miocardi en adults
Tenofovir	<ul style="list-style-type: none"> - Astènia, diarrea, nàusees, vòmits - Toxicitat tubular renal - Reducció del filtrat glomerular - Reducció de la massa mineral òssia
Emtricitavina	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicitat mínima - Hiperpigmentació palmo-plantar
Zalcitavina (en desús)	<ul style="list-style-type: none"> - Neuropatia perifèrica - Pancreatitis - Úlceres bucal

A2.2: ITINANs

ITINANs	<ul style="list-style-type: none"> - Reaccions d'hipersensibilitat cutània (+/- afectació sistèmica) - Hepatotoxicitat
Nevirapina	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatitis aguda greu
Efavirenz	<ul style="list-style-type: none"> - Disfunció del sistema nerviós central, amb trastorns del son i clínica psiquiàtrica. - Ginecomàstia - Teratogènia - Hiperlipèmia
Etravirina	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicitat mínima
Rilpivirina	<ul style="list-style-type: none"> - Cefalea, insomni - Depressió

A2.3: IPs

IPs	<ul style="list-style-type: none"> - Hipercolesterolèmia - Hipertrigliceridèmia - Hiperglucèmia, diabetis mellitus, resistència a la insulina - Síndromes lipodistròfics - Sagnat en pacients hemofílics - Ginecomastia - Disfunció sexual - Hepatotoxicitat - Anorèxia, nàusees i vòmits, flatulència.
Atazanavir	<ul style="list-style-type: none"> - Hiperbilirrubinèmia indirecta - Litiasi renal - Bloqueig auriculoventricular 1r grau - Rash cutani
Darunavir	<ul style="list-style-type: none"> - Rash cutani - Síndrome de Stevens Johnson, Eritema multiforme - Cefalea
Fosamprenavir	<ul style="list-style-type: none"> - Cefalea - Litiasi renal - Rash cutani - Síndrome de Stevens Johnson, Eritema multiforme
Indinavir	<ul style="list-style-type: none"> - Cefalea, visió borrosa, astènia, mareig - Litiasi renal - Hiperbilirrubinèmia indirecta - Anèmia hemolítica, trombocitopènia - Alopècia - Rash cutani - Gust metàlic
Lopinavir/r	<ul style="list-style-type: none"> - Allargament interval PR, allargament interval QT, "Torsade de Pointes" - Alteracions del gust.
Nelfinavir	<ul style="list-style-type: none"> - Elevació de transaminases
Ritonavir	<ul style="list-style-type: none"> - Parestèsies - Astenia - Trastorns del gust
Saquinavir	<ul style="list-style-type: none"> - Cefalea - Allargament interval PR, allargament interval QT, "Torsade de Pointes"
Tipranavir	<ul style="list-style-type: none"> - Rash cutani - Hemorràgia cerebral

Annexe 3: Components de la cadena respiratòria mitocondrial

Complexe I: NADH deshidrogenasa o NADH-CoQ reductasa

És el complexe de major tamany de la CRM, constituït per 45 subunitats proteiques, 7 de les quals codificades pel genoma mitocondrial. La seva forma d'"L" li permet estar en contacte amb el NADH produït a la MM.

Catalitza la reducció del CoQ a partir del NADH i permet la transferència de 4 H⁺ a EIM.

Complexe II: Succinat deshidrogenasa o Succinat-CoQ reductasa

El complexe de menor tamany, constituït únicament per 4 pèptids. Codificat exclusivament pel genoma nuclear.

Té la mateixa activitat que la succinat deshidrogenasa del Cicle de Krebs, constituint per tant un nexa entre aquest i la CRM. Catalitza la reducció del CoQ, oxidant-se el succinat a fumarat.

Complexe III: CoQH₂- CitC reductasa.

Format per 11 pèptids, un d'ells codificat en el genoma mitocondrial i la resta en el nuclear.

Catalitza la reducció del Cit C a partir del CoQ, permetent la transferència de 4 protons cap a l'EIM.

Complexe IV: CitC oxidasa (COX).

Compost per 13 subunitats, les més grans i més actives de les quals (I, II i III) són codificades pel genoma mitocondrial.

Catalitza la transferència d'electrons des del Cit C al seu acceptor final, l'oxigen, donant lloc a H₂O. Per cada molècula d'H₂O sintetitzada es transfereixen 2 protons a EIM.

Complexe V: ATP sintasa

A partir de fosfat inorgànic i ADP catalitza la síntesi d'ATP, gràcies al gradient de protons generat per la resta de complexos.

Conformat per dues subunitats (12-14 polipèptids): la F₀ que està integrada a la MMI i que constitueix el canal que permet el pas de protons i la F₁ que té activitat catalítica per a la producció d'ATP.

Codificat per genoma nuclear, excepte 2 polipèptids (A6 i A8), que són codificades pel genoma mitocondrial.

Glicerol-3-fosfat deshidrogenasa

És un enzim adjuvant que permet mantenir una fosforilació oxidativa a alta velocitat, ja que facilita l'entrada de poder reductor a l'interior de la mitocòndria. A partir del NADH obtingut en els processos de glucòlisi, la forma enzimàtica citosòlica obté el glicerol 3 fosfat que entrarà a l'interior de la MMI. Allí la forma mitocondrial de l'enzim generarà FADH₂ a partir de G3P i FAD, recuperant d'aquesta manera poder reductor a dins de la mitocòndria que entrarà a les reaccions de la CRM.

Coenzim Q₁₀ i Citocrom C:

Són transportadors d'electrons mòbils que es troben a la cara externa de la MMI. Transfereixen electrons entre els complexos II i III, i II i IV de la CRM, respectivament.